

**Untersuchungen zur Gen-Organisation
im Shaker-Genkomplex von *Drosophila melanogaster***

DISSERTATION

zur Erlangung des Grades
eines Doktors der Naturwissenschaften
der Abteilung für Chemie
an der Ruhr-Universität Bochum

vorgelegt von
RALF PETER SEIDEL

Bochum 1986

**Untersuchungen zur Gen-Organisation
im Shaker-Genkomplex von *Drosophila melanogaster***

DISSERTATION

zur Erlangung des Grades
eines Doktors der Naturwissenschaften
der Abteilung für Chemie
an der Ruhr-Universität Bochum

vorgelegt von

RALF PETER SEIDEL

Bochum 1986

Tag der mündlichen Prüfung: 21. Januar 1987

Prüfungsvorsitzender: Prof. Dr. W. R. Roth

1. Gutachter : Prof. Dr. O. Pongs

2. Gutachter : Prof. Dr. B.-J. Benecke

Herrn Prof. Dr. O. Pongs danke ich für die intensive Betreuung und Diskussionsbereitschaft während der Anfertigung dieser Arbeit. Mein besonderer Dank gilt A. Baumann für die gute Zusammenarbeit und Überlassung der λ -Phagen-DNA sowie Dr. N. Kecskemethy, B. Wenzel und K. Weber für ihre Hilfe bei der RNA-Isolierung und R. Müller für die zur Verfügung gestellten "Northern"-Analysen. Dr. U. Femfert und Dr. H.H. Kiltz danke ich für die Herstellung und Aufreinigung der Oligonukleotide.

Ganz herzlich danke ich Dr. R. Heiermann und A. Baumann für das Lesen des Manuskripts und die Zeit die sie für intensive Diskussionen aufgebracht haben.

Für die Durchführung der fotografischen Arbeiten danke ich K. Grabert und ebenso allen Mitgliedern des Lehrstuhls für Biochemie die auf ihre Weise zur Durchführung dieser Arbeit beigetragen haben.

INHALTSVERZEICHNIS

1.	<u>Einleitung</u>	1
2.	<u>Experimenteller Teil</u>	5
2.1.	Herkunft und Haltung der Fliegen	5
2.2.	Isolierung und Gelelektrophorese von RNA	5
2.2.1.	RNA-Isolierung	5
2.2.2.	Elektrophorese von RNA in Methyl-Quecksilber-Agarosegelen	6
2.2.3.	Formaldehyd-Agarosegele und Elektro-Transfer von RNA	7
2.3.	Herstellung der cDNA-Bibliothek	7
2.3.1.	Synthese einzelsträngiger cDNA	7
2.3.2.	Synthese doppelsträngiger cDNA	8
2.3.3.	Synthese homopolymerer Enden	8
2.3.3.1.	Herstellung linearer Vektor-DNA	8
2.3.3.2.	Synthese von oligo(dC)-Enden	9
2.3.3.3.	Synthese von oligo(dG)-Enden	9
2.3.4.	Hybridisierung von cDNA und Vektor	10
2.3.5.	Herstellung kompetenter Bakterien	10
2.3.6.	Transformation und Ausplattieren der Bibliothek	10
2.3.7.	Herstellung von Replika-Filtern und Lagerung der Bibliothek	11
2.4.	λ gt10 cDNA-Bibliotheken	11
2.5.	Herstellung radioaktiver Proben	11
2.5.1.	"Nick-Translation"	11
2.5.2.	Einzelsträngige M13-DNA	12
2.5.3.	<i>In vitro</i> RNA-Synthese	12
2.5.4.	5'-Endmarkierung	12
2.6.	Hybridisierungen	13
2.6.1.	Hybridisierung der "Kopf"- und λ gt10-Bibliothek	13
2.6.2.	Hybridisierung an immobilisierte DNA	14
2.6.3.	Hybridisierung an immobilisierte RNA	14
2.7.	Klonierungsmethoden	15
2.7.1.	Klonierungsvektoren	15
2.7.2.	Restriktion von DNA und Gelelektrophorese	15

2.7.3.	Isolierung von DNA aus Agarosegelen	15
2.7.4.	Dephosphorylierung von DNA	16
2.7.5.	Zurückschneiden von 3'-überhängenden DNA-Enden	17
2.7.6.	Ligation und Transformation	17
2.7.7.	Charakterisierung der Transformanden	18
2.8.	DNA-Sequenzierung	18
2.8.1.	Herstellung einzelsträngiger M13-DNA	18
2.8.2.	Sequenzierungsreaktion	18
2.8.3.	Gelelektrophorese	19
2.9.	Nuklease S1-Verdauung	19
2.10.	"Primer-extension"-Reaktion	20
2.11.	Sonstige Methoden	20
2.11.1.	Isolierung von λ -Phagen-DNA	20
2.11.2.	Isolierung gesamtgenomischer DNA	21
2.11.3.	Synthese und Reinigung von Oligonukleotiden	21
2.11.4.	TCA-Präzipitation von Nukleinsäuren	21
2.11.5.	Autoradiographie	21
2.11.6.	Auswertung der DNA-Sequenzdaten	21
3.	<u>Ergebnisse</u>	22
3.1.	Identifizierung von Transkripten	22
3.2.	Herstellung der cDNA-Bibliothek	25
3.2.1.	RNA-Isolierung	25
3.2.2.	Synthese einzel- und doppelsträngiger cDNA	25
3.2.3.	Präparation des Klonierungsvektors	28
3.2.4.	Synthese homopolymerer Enden	29
3.2.5.	Klonierung	29
3.3.	Isolierung und Charakterisierung von cDNA-Klonen	31
3.3.1.	Isolierung von cDNA-Klonen	31
3.3.2.	Restriktionsanalyse	32
3.3.3.	Bestimmung des kodierenden DNA-Strangs	32
3.3.4.	Nukleotidsequenz der cDNA-Fragmente	36
3.4.	Charakterisierung von Transkripten	42
3.4.1.	Transkriptgröße und relative Transkripthäufigkeit	42
3.4.2.	Transkript-Spezifität der pg1.5-cDNA	44

3.5.	Genomische Organisation der Transkripte	46
3.5.1.	Subklonierung und Restriktionsanalyse genomischer Fragmente	46
3.5.2.	Identifizierung transkribierter genomischer Bereiche	46
3.5.3.	Sequenzierung der genomischen DNA	53
3.5.4.	Bestimmung des Transkriptionsstarts	62
3.5.5.	Exon-Intron-Organisation	66
3.6.	Aminosäuresequenz	68
3.7.	Untersuchung an Shaker-Mutanten	68
3.7.1.	Analyse genomischer DNA	68
3.7.2.	Transkriptanalyse	72
4.	<u>Diskussion</u>	73
5.	<u>Zusammenfassung</u>	84
6.	<u>Literaturverzeichnis</u>	85

Abkürzungen

β-NAD	β-Nicotinamid-adenin-dinukleotid
Bp, Kbp	Basenpaare, Kilobasenpaare
BSA	Rinderserumalbumin
cpm	Zählereignisse pro Minute
Ci	Curie (1 Ci=3.7x10 ¹⁰ Becquerel)
DNA	Desoxyribonukleinsäure
cDNA	"copy" DNA
ds-CDNA	doppelsträngige cDNA
RF-DNA	Replikative Form der M13-Phagen-DNA
dNTP	2'-Desoxynukleotid-5'-Triphosphat
dATP	2'-Desoxyadenosin-5'-Triphosphat
dCTP	2'-Desoxycytosin-5'-Triphosphat
dGTP	2'-Desoxyguanosin-5'-Triphosphat
dTTP	2'-Desoxythymidin-5'-Triphosphat
ddNTP	2',3'-Didesoxynukleotid-5'-Triphosphat
NTP	Ribonukleotid-5'-Triphosphat
ATP, GTP, CTP, UTP	Adenosin-, Guanosin-, Cytosin-, Uridin-5'-Triphosphat
(m, r, t)RNA	(messenger, ribosomale, transfer) Ribonukleinsäure
Pipes	Piperazin-N,N'-bis(2-äthansulfonsäure
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
EDTA	Äthylendiamintetraessigsäure, Na-Salz
DTT	Dithiothreitol
SDS	Na-Dodecylsulfat
MOPS	(3-(N-Morpholino)-propan)-Sulfonsäure
IPTG	Isopropylthiogalactosid
QN+	Cetyltrimethylammoniumbromid
TCA	Trichloressigsäure
Upm	Umdrehungen pro Minute
UTP	Uridin-5'-Triphosphat
X-Gal	5-Brom-4-Chlor-3-indolyl-β-D-galactopyranosid
PVP	Polyvinylpyrrolidon

Herkunft der verwendeten Substanzen und Enzyme

Acrylamid	Fluka
Agarose	BRL
Ampicillin	Boehringer
Tetracyclin	Serva
Bisacrylamid	Serva
Cetyltrimethylammoniumbromid	EGA
Methylquecksilberhydroxid	Ventron GMBH
Chloramphenicol	Serva
Ficoll	Pharmacia
Lachssperma DNA	Sigma
Nylonmembran	Pall
Polyvinylpyrrolidon	Sigma
Bacto-Trypton/Hefeextrakt	Difco
G-75	Pharmacia
Röntgenfilme	Fuji, Agfa

³²-P markierte Nukleotide

NEN

Alkalische Phosphatase (EC 3.1.3.1)	Boehringer
Desoxyribonuklease I (EC 3.1.21.1)	Boehringer
DNA-Polymerase I (EC 2.7.7.7)	Boehringer
DNA-Polymerase I, Klenow-Enzym (EC 2.7.7.7)	Boehringer
E. coli DNA-Ligase (EC 6.5.1.2)	P-L Biochemicals
Lysozym (EC 3.2.1.17)	Merck
Nuklease S1 (E.C. 3.1.30.1)	Sigma
Proteinase K (EC 3.4.21.14)	Merck
Ribonuklease A (E.C. 3.1.27.5)	Sigma
Ribonuklease T1	Serva
Ribonuklease H (E.C. 3.1.26.4)	BRL
RNA-abhängige DNA-Polymerase (Reverse Transkriptase)	J. Beard, Life Science, USA

SP6-RNA-Polymerase (E.C.2.7.7.6)	Boehringer
T4-DNA-Polymerase (E.C. 2.7.7.7)	Boehringer
T4-DNA-Ligase (E.C. 6.5.1.1)	Boehringer/BRL
T4-Polynukleotidkinase (E.C. 2.7.1.78)	Boehringer
Terminale Transferase (E.C. 2.7.7.31.)	P-L Biochemicals
Restriktionsendonukleasen	Boehringer/BRL

Alle anderen Chemikalien (p.a. Qualität) wurden von Merck, Serva oder Fluka bezogen.

1. Einleitung

Die elektrophysiologischen Eigenschaften von Zellen werden durch den Austausch von Ionen über spezielle Zellmembran-Proteine bestimmt. Neben dem aktiven Ionentransport durch Na^+/K^+ -ATPasen (Skou 1965) erfolgt der Ein- und Ausstrom von Ionen über ionenselektive Na^+ -, K^+ -, Ca^{++} - und Cl^- -Kanäle, deren Ionen-Permeabilität auf unterschiedliche Weise reguliert wird (Hille 1978, Hille 1984, Adams 1980, Hagiwara & Byerly 1981, Petersen & Maruyama 1984).

Für die Aktivität elektrisch erregbarer Zellen, beispielsweise Nerven- und Muskel-Zellen, sind diese Kanäle von fundamentaler Bedeutung. Hodgkin & Huxley (1952) zeigten, daß die Depolarisierung der Membran während eines Aktionspotentials durch Aktivierung eines spannungsabhängigen Na^+ -Stroms (I_{Na}), die Repolarisierung durch einen verzögerten spannungsabhängigen K^+ -Strom (I_{K}) erfolgt. Zusätzlich wurden eine Reihe weiterer K^+ -Ströme identifiziert, unter anderem auch solche K^+ -Kanäle die spannungsabhängig, abhängig von der intrazellulären Ca^{++} -Konzentration oder von Neurotransmittern reguliert werden (Connor & Stevens 1971, Adams 1982, Reichhardt & Kelly 1983). Diese K^+ -Kanäle sind entscheidend an der Steuerung neuronaler Vorgänge beteiligt.

Die Plastizität des Nervensystems, d.h. die Fähigkeit die elektrophysiologischen Eigenschaften statischer, synaptischer Verschaltungen zu verändern, ist eine elementare Voraussetzung für einfache Lernprozesse (Gewöhnung, Sensitivisierung, klassische Konditionierung) und unter anderem auf die Beteiligung modulierbarer K^+ -Kanäle zurückführbar (Kandel 1981, Kandel & Schwartz 1982, Byrne 1985). Einige Befunde lassen vermuten, daß über die Wirkung von Proteinkinasen, die durch Neurotransmitter oder cAMP aktiviert werden (Review: Cohen 1982), die Eigenschaften der K-Kanäle modifiziert und dadurch die neuronale Aktivität verändert wird (Shuster et al. 1985, Stanfield et al. 1985, Aghajanian 1985, Ewald et al. 1985).

In einer Vielzahl von Vertebraten und Invertebraten ist ein transienter, spannungsabhängiger K^+ -Strom, der sogenannte I_{A} -Strom nachweisbar (Rogawski 1985), für den eine funktionelle Beteiligung

an der Repolarisierung der Membran (Tanouye 1981), der Regulation der zeitlichen Abfolge von Aktionspotentialen (Connor & Stevens 1975) und der Modulation der synaptischen Signalübertragung (Jan et al. 1983, Byrne 1980) gezeigt wurde. Eine Beziehung zwischen einfachen Lernvorgängen und der Änderung des I_A -Stroms wurde durch Untersuchungen am B-Typ Photorezeptor von *Hermisenda* nachgewiesen (Alkon et al. 1984, Farley & Auerbach 1986).

Die Isolierung von K^+ -Kanalproteinen ist bisher nicht erfolgt, da geeignete hochaffine Liganden nicht zur Verfügung stehen, wie sie beispielsweise zur Isolierung des spannungsabhängigen Na^+ -Kanals (Nakayama et al. 1982), des Acetylcholin-Rezeptors (Conti-Tronconi & Raftery 1982) und des spannungsabhängigen Ca^{2+} -Kanals (Curtis & Catterall 1984) verwendet wurden.

Eine Alternative bietet die Untersuchung von *Drosophila melanogaster* Mutanten mit neuronalen Defekten, die auf Veränderungen des K^+ -Stroms zurückzuführen sind (Hall 1982, Ganetzky & Wu 1985). Unter Zuhilfenahme genetischer und molekularbiologischer Methoden können die für die neuronalen Störungen verantwortlichen Gene identifiziert und isoliert werden. In diesem Zusammenhang sind umfangreiche Untersuchungen an Shaker (Sh)-Mutanten durchgeführt worden. Diese Mutanten sind durch das Zittern der Extremitäten und des Abdomens nach Äthernarkose charakterisiert (Kaplan & Trout 1969).

Elektrophysiologische Messungen am cervikalen Riesen-Axon verschiedener Sh-Mutanten zeigen, daß generell ein verändertes Aktionspotential nachweisbar ist (Tanouye et al. 1981, Tanouye & Ferrus 1985). Entweder wird eine verlängerte Repolarisationsphase (z.B. Sh^{KS133}) beobachtet oder die Repolarisierung verläuft unvollständig (Sh^5) unter Ausbildung zahlreicher Nachpotentiale. Salkoff & Wyman (1981) zeigten, daß im Flugmuskel normaler Fliegen, 72 Stunden nach Ausbildung der Puppe, ausschließlich ein I_A -Strom nachweisbar ist. In vergleichbaren Messungen an Sh-Mutanten wird eine Änderung des I_A -Stroms beobachtet. So ist in Sh^{KS133} der I_A -Strom völlig eliminiert, während in Sh^5 eine abnormal schnelle Inaktivierung dieses Stroms beobachtet wird (Salkoff 1983, Wu & Haugland 1985).

Folgende experimentelle Befunde lassen vermuten, daß die Ursachen

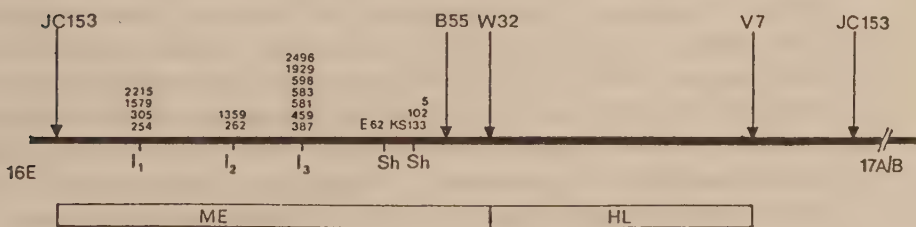
für den geänderten I_A -Strom in Sh-Mutanten defekte K^+ -Kanäle oder Kanaluntereinheiten sind. In Wildtyp-Fliegen wird nach Behandlung mit 4-Aminopyridin (4-AP), einem Inhibitor für frühe spannungabhängige K^+ -Kanäle, ein Aktionspotential beobachtet, das in Form und Dauer mit dem Aktionspotential von Sh^{KS133} vergleichbar ist. Ein Einfluß von 4-AP auf das Aktionspotential von Sh^{KS133} ist andererseits nicht zu beobachten (Tanouye et al. 1981).

Gen-Dosis-Analysen an Sh^{KS133} zeigen, daß der Sh-Phänotyp durch zusätzliche Wildtyp-Gene (Sh^+) nicht vollständig reprimiert werden kann. Dies deutet daraufhin, daß der Sh-Defekt auf ein abnormales Genprodukt zurückzuführen ist (Tanouye et al. 1981).

Cytogenetisch wurde der Sh-Bereich innerhalb der Chromosomen-Banden 16E-16F auf dem X-Chromosom lokalisiert.

Die Bruchpunkte unabhängig isolierter Translokations-Mutanten mit Sh-Phänotyp sowie EMS-induzierte Sh-Allele sind in verschiedenen Bereichen innerhalb der etwa 200 kbp umfassenden Sh-Region lokalisiert (Tanouye et al. 1981). Der Sh-Bereich stellt somit vermutlich eine Gen-Familie (Sh-Gen-Komplex) dar.

Die bisher vorliegenden genetischen Daten lassen sich wie folgt zusammenfassen (Tanouye et al. 1981, Tanouye et al. 1986, Salkoff & Tanouye 1986):



Der Sh-Gen-Komplex wird durch die Bruchpunkte der Translokationsmutanten $T(X,3)JC153$ und $T(X,Y)V7$ begrenzt. Innerhalb dieses Bereichs liegen die Bruchpunkte weiterer Translokationsmutanten ($T(X,Y)B55$; $T(X,Y)W32$). Mit Ausnahme von $T(X,3)JC153$ ist in diesen

Mutanten ein veränderter IA-Strom nachweisbar (Salkoff & Wyman 1983). Die dominanten Sh-Allele (z.B. Sh^{Ks133}) werden unmittelbar distal zu T(X;Y)B55 kartiert. Im Bereich zwischen JC153 und B55 liegen drei rezessiv-letale Komplementations-Gruppen (l₁-l₃). Der letale Effekt ist vorwiegend in relativ frühen Entwicklungsstadien der Fliege zu beobachten, was auf eine Beteiligung maternaler Gene schließen läßt (Maternaler-Effekt Bereich, A.Ferrus, pers. Mitteilung). Die Mutanten der l-Komplementationsgruppen zeigen keinen Sh-Phänotyp. Da in einigen Fällen ein verändertes Aktionspotential nachgewiesen wurde (Tanouye et al. 1986) ist nicht auszuschließen, daß die Letalität der Mutanten durch neuronale Defekte verursacht wird.

Die Region zwischen T(X;Y)W32 und T(X;Y)V7 wird als Haploletaler-Bereich bezeichnet, da Mutanten mit heterozygoten Defizienzen dieses Bereichs nicht lebensfähig sind.

Zur Untersuchung der molekularen Struktur des Sh-Bereichs wurde von verschiedenen Arbeitsgruppen DNA aus dieser Region isoliert (Tanouye et al. 1984, Kamb & Iverson 1984, Jan et al. 1985). Mit Hilfe einer Probe (adm135H4 cDNA-Klon, Wolfner 1980), die nach cytogenetischen Analysen aus dem chromosomalen Bereich 16F1-7 stammt, wurde ein λ -Phage (Mc λ) aus einer genomischen Drosophila DNA-Bibliothek (Maniatis et al. 1978) isoliert. Durch "chromosomales Wandern" (Isolierung überlappender genomischer DNA-Klone) wurden insgesamt 90kbp genomische DNA erhalten. *In situ*-Hybridisierungen der isolierten DNA an polytäre Speicheldrüsen-Chromosomen zeigen, daß die DNA einen großen Teil des Maternalen-Effekt-Bereichs ausgehend vom T(X,3)JC153 Bruchpunkt repräsentiert, wobei die DNA des Mc λ -Phagen unmittelbar distal zum B55-Bruchpunkt lokalisiert ist (A. Baumann, persönliche Mitteilung). Detaillierte Untersuchungen der in diesem Bereich liegenden Gene, mit Ausnahme von adm135H4, sowie die Identifizierung von Genen, die den Sh-Phänotyp hervorrufen, sind nicht bekannt.

Die vorliegende Arbeit beschreibt die Isolierung und teilweise Charakterisierung von Genen des Maternalen-Effekt Bereichs.

2. Experimenteller Teil

2.1. Herkunft und Haltung der Fliegen

Die Fliegen wurden entweder in Massenzuchtgefäßen oder in 30 ml Polystyrolröhrchen bei 26°C gehalten. Die verwendeten Medien sind bei Müller (1986) beschrieben.

Neben den beiden Wildtyp-Stämmen Oregon R und Canton S wurden folgende Mutanten-Stämme verwendet :

Sh^{Ks133}, B/C(1)DX, yf

Sh⁵, f⁵

Translokations-Mutanten:

T(X;Y)B55;B55^Py⁺/B55^DB^Sy/C(1)DX,ywf/Y

T(X,Y)W32;W32^Py⁺/W32^DB^Sywt/FM7a/O

T(X;Y)V7;V7^Py⁺/V7^DB^Sywt/FM7a/O

T(X;Y)B132/FM7b/Y

Sämtliche Mutantenstämme wurden von Dr. A. Ferrus (Madrid) zur Verfügung gestellt.

2.2. Isolierung und Gelelektrophorese von RNA

2.2.1. RNA-Isolierung

Die Isolierung von RNA aus verschiedenen Entwicklungsstadien von *D. melanogaster* ist detailliert bei Müller (1986) und Weber (1986) beschrieben.

Die Isolierung von RNA aus Köpfen adulter Fliegen erfolgte nach der von Chirgwin et al. (1979) beschriebenen Methode.

Um die Köpfe vom Thorax zu trennen wurden etwa 15 g Fliegen in einem Polypropylen-Röhrchen mit flüssigem Stickstoff eingefroren und kräftig geschüttelt. Zur Abtrennung der Köpfe von den restlichen Körperteilen wurden zwei Siebe mit unterschiedlicher Maschenweite verwendet.

Die tiefgefrorenen Köpfe wurden mit einem fünffachen Volumen Aufschluß-Puffer (4 M Guanidinthiocyanat, 50 mM Tris-HCl pH7.4, 2% (w/v) Na-Lauroylsarkosinat, 1% (v/v) 2-Mercaptoethanol) versetzt und mit einem Ultra-Turrax homogenisiert. Nach Zugabe eines

gleichen Volumens auf 65°C vorgewärmten Phenols wurde die Lösung kräftig geschüttelt und bei 65°C im Wasserbad inkubiert. Nach Zugabe eines halben Volumens 0.5 M Natriumacetat-Lösung und eines Volumens Chloroform wurden die Phasen erneut intensiv gemischt. Nach Abkühlen auf Eis wurde zentrifugiert (10000 Upm, 4°C, 10min, HB4). Die wässrige Phase wurde abgenommen, zweimal mit einem Volumen Phenol/Chloroform (1:1) und zweimal mit einem Volumen Chloroform extrahiert. Zur Phasentrennung wurde jeweils 10 min zentrifugiert (HB4, 10000 Upm, 4°C). Die wässrige Phase wurde abgenommen und die Nukleinsäuren mit 2.5 Volumina Ethanol über Nacht bei -20°C gefällt.

Zur Isolierung polyadenylierter RNA (Aviv & Leder 1972) wurde die ethanolgefällte Gesamt-RNA sedimentiert (HB4, 10000 Upm, 10min, 4°C). Der Niederschlag wurde mit 3ml 70%igem Ethanol gewaschen, rezentrifugiert und 2 min getrocknet (Ölpumpen-Vakuum). Das Pellet wurde in 3ml Bindungs-Puffer (0.5M NaCl, 10mM Tris-HCl pH7.4, 1mM EDTA, 0.1% (w/v) SDS) gelöst und auf eine mit Bindungspuffer äquilibrierte oligo(dT)-Cellulosesäule (2ml Bettvolumen) aufgetragen. Der Säulendurchlauf wurde 4-5mal rechromatographiert. Nach dem Waschen der Säule mit insgesamt 15 ml Bindungspuffer wurde die poly(A⁺)-haltige RNA mit 8 ml Elutionspuffer (10 mM Tris-HCl pH7.4, 1mM EDTA, 0.2% (w/v) SDS) eluiert und mit 2.5 Volumina Ethanol bei -20°C über Nacht präzipitiert.

2.2.2. Elektrophorese von RNA in Methyl-Quecksilberhydroxid-Gelen (Bailey & Davidson, 1976)

Verwendet wurden vertikale 1.2%ige Agarose-Gele in 1x Gelpuffer (50mM H₃BO₃, 5mM Na₂B₄O₇ x 10 H₂O, 10mM Na₂SO₄, 1mM EDTA, pH 8.2). 0.5-5 µg RNA wurden in 5 µl Wasser aufgenommen und mit dem gleichen Volumen 2xProbenpuffer (25µl CH₃HgOH, 230µl 86%iges Glycerin, je 0.2% (w/v) BPB und Xylen Cyanol FF, mit H₂O auf 1ml) gemischt und 10 min bei 30°C inkubiert. Die Elektrophorese erfolgte in 1x Gelpuffer mit 6V/cm. Zum Nachweis der RNA wurde das Gel anschließend 30min in Färbelösung (0.5M NH₄OAc, 0.5µg/ml Ethidiumbromid) inkubiert.

2.2.3. Formaldehyd-Gele und Elektrottransfer von RNA

Zur Fraktionierung von RNA wurden Formaldehyd-Agarosegele verwendet, wenn anschließend ein Transfer der RNA auf Nylonmembranen erfolgte.

Zur Herstellung der Gele wurden 0.72 g Agarose in 43.4 ml Wasser aufgeschmolzen. Nach Abkühlung auf etwa 60°C wurden 6 ml 10x MOPS-Puffer (0.2M MOPS pH7.0, 0.05 M NaOAc, 1 mM EDTA) sowie 10.7 ml einer 37%igen Formaldehyd-Lösung zugegeben und das Gel (11x14cm) gegossen.

1-5 µg RNA wurden in 10 µl Probenpuffer (50% Formamid, 2.2M Formaldehyd, 1x MOPS-Puffer, je 0.07% Bromphenolblau und Xylen Cyanol FF) gelöst und 10 min bei 50°C denaturiert.

Die Elektrophorese wurde in 1x MOPS-Puffer bei einer Spannung von 100 V durchgeführt. Vor dem Transfer wurde das Gel 10 min in 1x Transferpuffer (3 mM Zitronensäure, 3.8 mM Na₂HPO₄) äquilibriert. Der Transfer auf die Nylonmembran (Pall, 0.2 µm) erfolgte elektrophoretisch in 1x Transferpuffer für 1 h bei 40 V sowie weitere 3 h bei 80 V. Die Nylonmembran wurde luftgetrocknet und 2-3 h bei 80°C im Vakuum gebacken.

2.3. Herstellung der cDNA-Bibliothek

2.3.1. Synthese einzelsträngiger cDNA

Zur Herstellung der cDNA-Bibliothek wurde RNA aus Köpfen von adulten Fliegen verwendet (siehe 2.2.)

Die Synthesereaktion wurde in einem Volumen von 25 µl durchgeführt. Im einzelnen wurden 2 µg poly(A⁺)-RNA (1 µg/µl), 2.5 µl 0.5 M KCl, 2.5 µl 1M Tris-HCl pH8.3, 2 µl Oligo(dT)₁₂₋₁₈ (1 µg/µl) zusammengegeben und mit H₂O auf 16 µl aufgefüllt. Der Ansatz wurde 30 min bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend zu einem lyophilisierten Nukleotidmix (je 2 µl 10 mM dNTPs) gegeben. Nach der Zugabe von 2.5 µl 0.1 M MgCl₂, 1 µl 0.3 M DTT, 3.5 µl H₂O und 2 µl Reverse Transkriptase (11 Einheiten/µl) wurde der Ansatz 2.5 Stunden bei 42°C inkubiert. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 4 µl 0.2M EDTA beendet. Der Ansatz wurde einmal mit Phenol/Chloroform sowie einmal mit CHCl₃ extrahiert und anschließend zweimal aus 2 M NH₄OAc

mit Ethanol gefällt (Okayama & Berg 1982). Die synthetisierte cDNA wurde mit einer Konzentration von 50ng/µl in TE aufgenommen.

2.3.2. Synthese doppelsträngiger cDNA

Die Synthese erfolgte analog zu den von Gubler & Hoffman (1983) beschriebenen Bedingungen in 100µl Ansätzen mit den folgenden Konzentrationen:

5 µg/ml einzelsträngige cDNA
20 mM Tris-HCl pH7.5
5 mM MgCl₂
10 mM (NH₄)₂SO₄
100 mM KCl
0.15 mM β-NAD
50 µg/ml BSA
je 40 µM dNTP
8.5 Einheiten/ml RNaseH
230 Einheiten/ml DNA-PolymeraseI
10 Einheiten/ml E. coli DNA-Ligase

Die Inkubation erfolgte für 60 min bei 12°C und anschließend 90 min bei 22°C. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 15 µl 0.2M EDTA beendet, der Ansatz wie in 2.3.1. beschrieben Phenol/Chloroform extrahiert, ethanolgefällt und die doppelsträngige cDNA in TE-Puffer aufgenommen (50 ng/µl).

2.3.3. Synthese homopolymerer Enden

2.3.3.1. Herstellung linearer Vektor-DNA

50µg pAT153 (Twigg & Sherrat, 1980) wurden in einem Volumen von 200µl mit 50 Einheiten SphI (Fuchs et al. 1980) für 2h bei 37°C in Restriktionspuffer (6mM Tris-HCl pH 7.6, 125mM NaCl, 6mM MgCl₂, 7mM 2-Mercaptoethanol) linearisiert. Der Ansatz wurde zweimal mit Phenol/Chloroform extrahiert und aus 2M NH₄OAc mit 2.5 Volumina Ethanol gefällt. Die lineare Vektor-DNA wurde auf einem präparativen, niedrigschmelzenden 0.8%igen Agarosegel von ungeschnittenem Plasmid getrennt, unter langwelligem UV-Licht

ausgeschnitten und die DNA nach der unter 2.7.3. beschriebenen Methode aus der Agarose extrahiert.

Die DNA-Konzentration wurde mit Wasser auf 5 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ eingestellt und diese Lösung bei -70°C gelagert.

2.3.3.2. Synthese von Oligo(dC)-Enden

Die Synthese homopolymerer (dC)-Enden erfolgte in 20 μl Ansätzen :

2 μl linearer pAT153 (5 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$)

2 μl Prämix (200 μM dCTP, 10 mM CoCl_2)

4 μl 1 M Kaliumcacodylat pH6.9

2 μl BSA (50 mg/ml)

9 μl Wasser

1 μl Terminale Transferase (29 Einheiten/ μl)

Der Ansatz wurde 50min bei 37°C inkubiert und anschließend die Synthese durch Zugabe von 4 μl 0.5 M EDTA beendet. Die gesamte Probe wurde zur Aufreinigung auf einem 0.8%igen Agarosegel entsprechend 2.3.3.1. fraktioniert und die DNA extrahiert (2.7.3.). Die DNA-Konzentration wurde mit Wasser auf 25 $\text{ng}/\mu\text{l}$ eingestellt und die Lösung bei -70°C gelagert.

2.3.3.3. Synthese homopolymerer (dG)-Enden

Die Synthese der oligo(dG)-Enden an die doppelsträngige cDNA erfolgte in 20 μl Ansätzen:

1 μl ds-cDNA (50 $\text{ng}/\mu\text{l}$)

2 μl Prämix (9 mM dGTP, 10 mM CoCl_2)

4 μl 1M Kaliumcacodylat pH6.9

2 μl BSA (10 mg/ml)

10 μl Wasser

1 μl Terminale Transferase (29 Einheiten)

Der Ansatz wurde 60min bei 37°C inkubiert und anschließend die Reaktion durch Hitzeinaktivierung des Enzyms (10 min, 65°C) beendet. Die DNA-Konzentration wurde mit TE-Puffer (10 mM Tris-HCl pH8, 1mM EDTA) auf 0.5 $\text{ng}/\mu\text{l}$ eingestellt.

2.3.4 Hybridisierung von cDNA und Vektor

Zur Verknüpfung der mit homopolymeren Enden versehenen Vektor- und cDNA wurden 250 ng Vektor und 10 ng cDNA in 500µl Hybridisierungspuffer (10mM Tris-HCl pH7.5, 150mM NaCl, 1mM EDTA) für 15min auf 70°C erwärmt, anschließend 3h bei 58°C inkubiert und über Nacht in einem Dewar-Gefäß langsam auf Raumtemperatur abgekühlt. Die Hybridisierungsansätze wurden bei -20°C gelagert.

2.3.5. Herstellung kompetenter Bakterien

Ausgehend von einer Einzelkolonie E.coli C600 (Appleyard 1954) in LB-Medium (1% (w/v) Bacto-Trypton, 0.5% (w/v) Hefe-Extrakt, 1% (w/v) NaCl) wurden die Bakterien bis zu einer Dichte von 0.6 A579 gezogen. Die Bakterien wurden sedimentiert (10min, 5000 Upm, 0°C, GSA) und in einem halben Volumen eiskalter 50mM CaCl₂-Lösung resuspendiert. Nach 5min Inkubation auf Eis wurden die Bakterien erneut abzentrifugiert, in 1/30 Volumen 50 mM CaCl₂-Lösung resuspendiert und 1 Stunde auf Eis inkubiert. Nach Zugabe eines gleichen Volumens Einfrierlösung (40% Glycerin, 50 mM CaCl₂) wurde die Bakteriensuspension portioniert, in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -70°C gelagert.

2.3.6. Transformation und Ausplattieren der cDNA-Bibliothek

Zur Transformation wurden 100µl des Hybridisierungsansatzes (siehe 2.3.4.) zu 200µl kompetenten E. coli C600 (siehe 2.3.5.) gegeben. Nach 10min auf Eis wurde ein Hitzeschritt (5min, 37°C) durchgeführt. Der Transformationsansatz wurde nach Zugabe von 700 µl LB-Medium zur Erholung der Bakterien 60 min im Schüttelinkubator bei 100 Upm inkubiert.

10 Transformationsansätze wurden nach der Erholungsphase vereinigt und zentrifugiert (3000 Upm, 10min, 20°C, Sigma 2K). Der Überstand wurde abgenommen und die Bakterien in 1.5ml LB-Medium mit 100µg/ml Ampicillin resuspendiert.

Sterile Nylonmembranfilter (Pall, 13.2 cm Ø) wurden luftblasenfrei auf eine LB-Amp-Platte (1.5% Agar in LB-Medium mit 100µg/ml Ampi-

cillin) gelegt und die Bakteriensuspension darauf ausgestrichen. Die Platten wurden bei 30°C bebrütet bis die Kolonien gerade erkennbar waren.

2.3.7. Herstellung von Replika-Filtern und Lagerung der Bibliothek

Die Herstellung von Filter-Replikas erfolgte nach der von Hanahan und Meselson (1980) beschriebenen Methode. Von jedem Mutterfilter wurden drei Replikas angefertigt. Zwei der Filter wurden für die Hybridisierungen verwendet, das dritte wurde auf einer Einfrier-LB-Platte (1.5% Agar in LB-Medium mit 5% Glycerin) für 2h bebrütet. Das Filter wurde von der Platte genommen mit einem zweiten Filter bedeckt, zwischen feuchtem Papier (Whatman 3MM) in einer Plastikfolie verschweißt und bei -70°C gelagert.

Die Hybridisierungsfiler wurden 6-8 Stunden auf LB-Platten (mit 100µg/ml Ampicillin) bei 37°C bebrütet. Zur Amplifizierung wurden die Filter auf LB-Platten die 100µg/ml Chloramphenicol enthielten überführt und über Nacht bei 37°C inkubiert.

Die Platten mit den Mutterfiltern wurden bei 4°C gelagert.

2.4. λgt10 cDNA-Bibliothek

Die in dieser Arbeit verwendeten λgt10 cDNA-Bibliotheken wurden von M. Goldschmidt-Clermont zur Verfügung gestellt.

Eine Bibliothek wurde mit RNA aus Tieren des frühen und späten 3. Larvenstadiums, die zweite Bibliothek aus 4-7 Stunden alten Embryonen hergestellt. Die Präparation der Bibliotheken erfolgte nach dem von Huynh et al. (1984) beschriebenen Verfahren.

2.5. Herstellung radioaktiv-markierter Proben

2.5.1. " Nick Translation "

100ng DNA (Plasmide, DNA-Fragmente) wurden mit 20 µCi α-³²P-dATP (800Ci/mmol) wie bei Maniatis et al. (1982) beschrieben radioaktiv markiert. Die freie Radioaktivität wurde durch Chromatographie auf

einer Sephadex G-75 Säule abgetrennt.

2.5.2. Einzelsträngige M13-DNA

Die Markierung erfolgte wie bei Burke (1984) beschrieben.

7 μ l einzelsträngige M13-DNA (1-2 μ g) (siehe 2.8.) wurden mit 2 μ l 17mer-Sequenzierungsprimer (Pharmacia) und 1 μ l 10x Puffer (0.5M NaCl, 100mM Tris-HCl pH7.5, 50mM MgCl₂) für 5min auf 100°C erwärmt und innerhalb von einer Stunde auf Raumtemperatur abgekühlt. Nach der Zugabe von 7 μ l Nukleotidmix (je 1mM dCTP, dGTP, dTTP), 3 μ l α -³²P-dATP (10 μ Ci/ μ l, 800Ci/mmol) und 2 Einheiten Klenow-Enzym wurde 1 Stunde bei 25°C inkubiert. Nach der Zugabe von 2 μ l Nukleotidmix (je 1mM dNTP) wurde die Reaktion 30min bei 25°C fortgesetzt. Die doppelsträngigen DNA-Bereiche wurden mit Endonukleasen herausgeschnitten, über ein niedrigschmelzendes Agarosegel getrennt und aus der Agarose extrahiert (siehe 2.7.3.).

2.5.3. In vitro RNA-Synthese

pSP64-Vektoren mit einklonierten DNA-Fragmenten wurden analog zu der von Melton et al. (1984) und Krieg und Melton (1984) beschriebenen Methode zur Transkription eingesetzt.

Die linearisierte DNA wurde in Gegenwart der vier rNTPs (je 0.5 mM ATP, GTP, CTP, 12.5 μ M UTP, 40 μ Ci α -³²P-UTP) in einem Reaktionsvolumen von 20 μ l mit SP6-RNA-Polymerase (20 Einheiten/ μ g DNA) 1h bei 40°C inkubiert. Die DNA wurde anschließend mit DNase I (13 μ g/Ansatz) verdaut, die RNA aus 3M NH₄OAc ethanolgefällt, dreimal mit 75% Ethanol/ 0.5 M NH₄OAc und einmal mit absolutem Ethanol gewaschen.

2.5.4. 5'-Endmarkierung

Dephosphorylierte DNA-Fragmente (siehe 2.7.4.) oder Oligonukleotide (siehe 2.11.3.) wurden in 70 mM Tris-HCl pH7.5, 10 mM MgCl₂, 5mM DTT mit einem zweifachen Überschuß an γ -³²P-ATP (7000Ci/mmol), bezogen auf die vorliegenden 5'-Enden, und 1 Einheit T4 Polynukleotid-Kinase/pmol 5'-Ende drei Stunden bei 37°C inkubiert. Das

Enzym wurde 5min bei 65°C inaktiviert, die DNA auf einem niedrig schmelzenden 1%igen Agarosegel getrennt und die entsprechenden Fragmente aus dem Gel extrahiert (siehe 2.7.3.).

2.6. Hybridisierungen

2.6.1. Hybridisierung der "Kopf"- und λ gt10 cDNA-Bibliothek

Die Replika-Filter wurden wie bei Maniatis et al. (1982) beschrieben mit 0.5M NaOH/ 1.5M NaCl 5 min denaturiert und anschließend 10min in 0.5M Tris-HCl pH7.4/ 1.5M NaCl neutralisiert. Die luftgetrockneten Filter wurden 2h bei 80°C im Vakuum gebacken.

Die Filter der λ gt10-Bibliothek wurden 6-10 Stunden bei 65°C mit 5-10ml Vorhybridisierungs-Lösung/Filter inkubiert.

Die Bakterienfilter der "Kopf"-cDNA Bibliothek wurden 12 Stunden bei 37°C in einer Proteinase K-Lösung (4x SET, 0.5% (w/v) SDS, 0.1 mg/ml Proteinase K) und anschließend 14 Stunden bei 65°C in Vorhybridisierungs-Lösung inkubiert, die zusätzlich 0.1mg/ml Hefe-tRNA, je 10 μ g/ml poly A und poly C enthielt.

Zur Hybridisierung wurden die Filter einzeln in Plastikfolie verschweißt. Die Hybridisierung erfolgte in einem Volumen von 3-5ml Vorhybridisierungs-Lösung, die 5x10⁶-1x10⁷ cpm/ml der radioaktiven Probe enthielt, für 16 Stunden bei 65°C. Die unspezifisch gebundene Radioaktivität wurde durch Waschen mit 1xSET/ 0.1% (w/v) SDS-Lösung entfernt (15min Raumtemperatur, 2x 1h 65°C).

20xSET : 3M NaCl; 0.4M Tris-HCl pH7.8, 0.02M EDTA

50x Denhard's (Denhard 1966):

10g/l Ficoll 400, 10g/l PVP, 10g/l BSA

Vorhybridisierungs-Lösung:

4x SET, 5x Denhard's; 0.1% (w/v) SDS; 0.1 mg/ml denaturierte Lachssperma-DNA

2.6.2. Hybridisierung an immobilisierte DNA

Die nach der von Southern (1975) beschriebenen Methode hergestellten DNA-Blots wurden analog zu der in 2.6.1. beschriebenen Methode denaturiert. Die Vorhybridisierung und Hybridisierung mit "nick translatierter" DNA wurde unter den in 2.6.1. beschriebenen Bedingungen durchgeführt, lediglich die Hybridisierungszeiten wurden verkürzt (Vorhybridisierung 2-3 Stunden, Hybridisierung 6-8 Stunden).

Die Filter wurden 15min bei Raumtemperatur, anschließend zweimal 30min bei 65°C mit 1x SET/ 0.1% SDS gewaschen.

2.6.3. Hybridisierung an immobilisierte RNA

RNA-Blots (siehe 2.2.3) wurden 6 Stunden bei 42°C vorhybridisiert.

Vorhybridisierungs-Lösung:

50% Formamid (deionisiert)

5x SSC (0.75M NaCl, 0.075M Na-Citrat)

50mM Na-Phosphat pH 6.5

5x Denhard's

0.1% (w/v) SDS

0.5 mg/ml denaturierte Lachssperma-DNA

Die Hybridisierung der RNA-Blots wurde mit "nick translatierten" Proben (2.5.1.) bei 42°C, mit *in vitro* transkribierten RNA-Proben (2.5.3.) bei 58°C für 48 Stunden in Vorhybridisierungs-Lösung durchgeführt, die 5×10^6 - 1×10^7 cpm/ml der jeweiligen Proben enthielt.

Für die Hybridisierungen mit nicht radioaktiver, einzelsträngiger M13-DNA wurde die Probe in einer Konzentration von 0.5 µg/ml Vorhybridisierungs-Lösung eingesetzt und 48 Stunden bei 42°C hybridisiert. Die unspezifisch gebundene DNA wurde durch Waschen mit 2xSSC/0.1% SDS (2x30 min, Raumtemperatur) und 0.2xSSC/0.1% SDS (2x 30min, 65°C) entfernt. Nach erneuter Vorhybridisierung (1 Stunde, 42°C) wurde der Blot mit "nick translatierter" M13RF-DNA ($1-5 \times 10^6$ cpm/ml Vorhybridisierungs-Lösung) 12-14 h bei 42°C

hybridisiert.

Das Waschen der Filter erfolgte mit steigender Stringenz in 1x SSC/ 0.1% SDS (2x 10 min, Raumtemperatur, 2x 20min bei 65°C) und 0.1x SSC/ 0.1% SDS (2x30 min bei 65°C).

2.7. Klonierungsmethoden

2.7.1. Klonierungsvektoren

Für die Klonierungen wurden die Plasmide pAT153 (Twigg & Sherrat 1980), pSP64 (Melton et al. 1984), M13mp18/19 (Messing et al. 1981) und pUC18/19 (Messing & Vierra 1982) verwendet.

Die Plasmide wurden präparativ nach der von Birnboim & Doly (1979) beschriebenen Methode mit den von Maniatis et al. (1982) angegebenen Modifikationen isoliert. Zur Herstellung RNA-freier Plasmide wurden die bei Heiermann (1984) beschriebenen zusätzlichen Schritte eingefügt.

2.7.2. Restriktion von DNA und Gelelektrophorese

Die Restriktion der DNA mit Endonukleasen erfolgte unter den vom Hersteller des Enzyms angegebenen Salz- und Temperatur-Bedingungen, die Auftrennung der Fragmente auf 0.8 - 1.5%igen Agarosegelen. Für Restriktionsanalysen wurde normale Agarose und 1x TEB-Puffer (90 mM Tris-Base, 90 mM Borsäure, 0.9 mM EDTA), zur Isolierung von DNA-Fragmenten (siehe 2.7.3.) Gele aus niedrig schmelzender Agarose in 1x TEA-Puffer (40 mM Tris-OAc pH8.0, 1 mM EDTA) verwendet.

Sowohl die Gele als auch die zur Elektrophorese verwendeten Laufpuffer (1xTEB und 1xTAE) enthielten 0.4µg/ml Ethidiumbromid. Die Proben wurden nach Zugabe von 3x Probenpuffer (20% Ficoll 400, 3x TEB, je 0.15% Bromphenolblau und Xylencyanol) aufgetragen.

2.7.3. Isolierung von DNA aus Agarosegelen

Die Extraktion von DNA aus niedrig schmelzenden Agarosegelen erfolgte mit Cetyltrimethylammoniumbromid (QN⁺) nach der von

Langridge et al. (1980) beschriebenen Methode mit einigen Änderungen.

Vor der Verwendung wurde das QN⁺-Salz einmal aus Wasser umkristallisiert, mit Aceton gewaschen, getrocknet und bei -70°C gelagert.

Die benötigten QN-Lösungen wurden jeweils unmittelbar vor Gebrauch angesetzt.

Eine 1%ige (w/v) Lösung von QN⁺ in wassergesättigtem n-Butanol wurde mit einem gleichen Volumen n-Butanol-gesättigtem Wasser versetzt und die Phasen kräftig durchmischt. Zur Trennung der Phasen wurde 10 Minuten in einer Eppendorf Tischzentrifuge zentrifugiert.

Die beiden Phasen (QN/Butanol und QN/Wasser) wurden separiert und auf 65°C erwärmt.

Zur Extraktion der DNA wurde das aus dem Gel ausgeschnittene Agarose-Stück 10 Minuten bei 65°C aufgeschmolzen, mit einem gleichen Volumen QN/Wasser versetzt und 20 Sekunden kräftig durchmischt (Vortex). Nach Zugabe eines gleichen Volumens QN/Butanol wurde erneut 20 Sekunden gemischt und anschließend 30 Sekunden in einer Eppendorf-Tischzentrifuge zentrifugiert. Die Butanol-Phase wurde abgenommen, bei Raumtemperatur aufbewahrt und die Extraktion wiederholt. Die vereinigten Butanolphasen wurden mit einem geeigneten Volumen (5 - 50 µl) 0.2 M NaCl-Lösung reextrahiert. Die NaCl-Phase wurde dreimal mit Chloroform extrahiert und die Chloroform-Reste im Vakuum abgedampft.

2.7.4. Dephosphorylierung von DNA

0.5-5µg lineares Plasmid oder DNA-Fragmente wurden in insgesamt 47.5µl Wasser aufgenommen. Nach Zugabe von 2.5µl 1M Tris pH9.5 wurde 1 Einheit alkalische Phosphatase/pmol 5'-Enden zugegeben und 1 Stunde bei 37°C inkubiert. Die Reaktion wurde mit 2µl 10mM EDTA beendet und das Enzym 30min bei 65°C inaktiviert. Die Probe wurde einmal mit Phenol/Chloroform und einmal mit Chloroform extrahiert, mit Probenpuffer (siehe 2.7.2.) versetzt und auf ein niedrig schmelzendes Agarosegel aufgetragen. Nach der Elektrophorese wurde die entsprechende DNA unter langwelligem UV-Licht ausgeschnitten und aus der Agarose extrahiert (siehe 2.7.3.).

2.7.5. Zurückschneiden von 3'-überhängenden DNA-Enden

Diese Reaktion wurde zum Zurückschneiden von ApaI-Enden verwendet. Der Inkubationsansatz enthielt:

- 15 µl DNA (10pmol 3'-Enden)
- 2 µl 10x Puffer (330mM Tris-OAc pH7.5, 660mM KOAc, 100mM Mg(OAc)₂)
- 1 µl 2mM dCTP, 2mM dGTP
- 1 µl T4 DNA-Polymerase (7.8 Einheiten)

Die Probe wurde 5 Minuten bei 37°C inkubiert, die DNA jeweils einmal mit Phenol/Chloroform und Chloroform extrahiert und ethanolgefällt.

2.7.6. Ligation und Transformation

Abhängig von der Fragmentgröße wurden die molaren Verhältnisse von Vektor zu Fragment variiert. Für Fragmente bis 1000bp wurde ein vierfacher Überschuß an Vektor-DNA, für größere Fragmente ein dreifacher Überschuß an Fragment verwendet.

Die Ligationsansätze enthielten in 20µl Gesamtvolumen 50-100ng Vektor-DNA, eine entsprechende Menge des DNA-Fragments und 2µl 10x Puffer (660mM Tris-HCl pH7.6, 66mM MgCl₂, 100mM DTT, 10mM ATP). Nach Zugabe von 0.5 Einheiten T4 DNA-Ligase wurde 1-5 Stunden bei Raumtemperatur inkubiert.

Ligationsansätze, die Plasmide mit Antibiotika-Resistenzen (pAT153, pUC18/19, pSP64) enthielten, wurden wie unter 2.3.6. beschrieben in E. coli C800 transformiert.

Für M13mp18/19RF-DNA wurde E.coli JM103 (Perron et al. 1985) als Wirt verwendet. Die Herstellung der kompetenten Bakterien erfolgte wie unter 2.3.5. beschrieben. Zur Transformation wurden die Ligationsansätze mit Wasser auf 100 µl aufgefüllt zu 200 µl kompetenten JM103-Bakterien gegeben und 30 Minuten auf Eis inkubiert. Nach Zugabe von 2.5ml Weichagar (8g Agar/l LB-Medium, 0.25mg/ml IPTG, 0.2mg/ml X-Gal) wurde auf LB-Platten ausplattiert und 8-14 Stunden bei 37°C inkubiert.

2.7.7. Charakterisierung der Transformanden

Plasmid- und M13RF-DNA wurde wie bei Maniatis et al. (1982) beschrieben aus 1.5ml Kulturen isoliert und durch Restriktionsanalysen charakterisiert.

2.8. DNA-Sequenzierung

2.8.1. Herstellung einzelsträngiger M13-DNA

Eine ü.N. Kultur JM103 wurde mit LB-Medium 1:100 verdünnt, 1.5ml mit einem Plaque angeimpft und 6h bei 37°C im Warmluftschüttler inkubiert.

Die Bakterien wurden durch eine kurze Zentrifugation sedimentiert, der Überstand abgenommen und rezentrifugiert (5min Eppendorf-Tischzentrifuge). Zu 1.3ml des Überstands wurden 180µl 20%iges PEG 6000 in 2.5M NaCl gegeben und 1 Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Die Lösung wurde 10 min zentrifugiert, der Überstand vollständig abgenommen, das Pellet in 100µl TES (10mM Tris-HCl pH7.5, 1mM EDTA, 10mM NaCl) gelöst und einmal mit Phenol/Chloroform sowie zweimal mit Chloroform extrahiert. Die DNA wurde aus 0.3M NaOAc pH5.2 über Nacht bei -20°C mit Ethanol gefällt. Die präzipitierte DNA wurde sedimentiert (10 min, Eppendorf-Tischzentrifuge), zweimal mit 70%igem Ethanol gewaschen, getrocknet und in 30µl TE (10mM Tris-HCl pH8.0, 1mM EDTA) gelöst.

2.8.2. Sequenzierungsreaktion

Zu 5µl einzelsträngiger M13-DNA wurden 1µl Sequenzierungsprimer (0.001 Azso/ml, Pharmacia) oder 1µl (4pmol) eines speziell synthetisierten Oligonukleotids (siehe 2.11.3.), 1µl 10x TMN-Puffer (70mM Tris-HCl pH7.5, 70mM MgCl₂, 500mM NaCl) gegeben und der Ansatz mit Wasser auf 10µl aufgefüllt.

Zur Hybridisierung wurde der Ansatz 3 Minuten auf 95°C erwärmt und anschließend 1 Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Nach Zugabe von 2µl α-³²P-dATP (700 Ci/mmol) und 1µl DNA Polymerase I (Klenow-Fragment) wurden 4x 2.5µl entnommen, in vier Reaktionsgefäße gegeben, die jeweils 2µl einer entsprechenden

dNTP/ddNTP-Lösung enthielten und die Proben 20 min bei Raumtemperatur inkubiert. Nach Zugabe von 2µl dNTP-Lösung (0.25mM für alle vier dNTPs) wurde weitere 15min inkubiert. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 5µl Probenpuffer (90% Formamid, 1mM EDTA, je 0.15% Xylen Cyanol FF und Bromphenolblau) beendet.

Zusammensetzung der dNTP/ddNTP-Lösungen (Angaben in µl):

	A	G	C	T
0.5 mM dATP	1	1	1	1
0.5 mM dGTP	250	12.5	250	250
0.5 mM dCTP	250	250	12.5	250
0.5 mM dTTP	250	250	250	12.5
10 mM ddATP	4	-	-	-
10 mM ddGTP	-	8	-	-
10 mM ddCTP	-	-	4	-
10 mM ddTTP	-	-	-	25
TE (pH 8.0)	250	500	500	500
ddNTP:dNTP	40:1	16:1	8:1	40:1

2.8.3. Gelelektrophorese

Die Reaktionsansätze wurden 2 Minuten bei 95°C denaturiert und in Eiswasser abgekühlt. Jeweils 1.5µl wurden auf 8% Polyacrylamid/ 8M Harnstoff-Gele (54x25x0.04cm) aufgetragen. Die Elektrophorese wurde bei konstanter Leistung (50W) durchgeführt.

Die Gele wurden 20 min in 7.5%iger Essigsäure fixiert, getrocknet und über Nacht autoradiographiert.

2.9. Nuklease S1-Verdauung

Zur Nuklease S1-Analyse (Berk & Sharp 1977) wurden 5'-endmarkierte DNA-Fragmente (siehe 2.5.4.) oder einzelsträngig markierte M13-DNA (siehe 2.5.2.) verwendet.

Das DNA-Fragment (0.01 pmol) wurde zusammen mit 5µg polyA+-RNA ethanolgefällt. Der Niederschlag wurde abzentrifugiert (10 min, 15000 Upm, -10°C, SE12), mit 70%igem Ethanol gewaschen, getrocknet und in 20µl Hybridisierungspuffer (40mM PIPES pH6.4, 400mM NaCl, 1mM EDTA, 80% Formamid) gelöst. Die Nukleinsäuren wurden 30 Minuten bei 85°C denaturiert und anschließend 3-4 Stunden bei

einer entsprechenden Temperatur hybridisiert.

Die Hybridisierungstemperaturen wurden über den G/C-Gehalt der Fragmente ermittelt (bis 50% G/C : 49°C; größer 50% G/C : 52°C). Zur Nuklease S1-Verdauung wurden 300µl S1-Puffer (300 Einheiten/ml Nuklease S1, 30mM NaOAc pH 4.5, 280mM NaCl, 4.5mM Zn(OAc)₂, 30µg/ml denaturierte Lachssperma-DNA) zugesetzt und für 15 min bei 37°C inkubiert. Nach Zugabe von 50µl Stop-Lösung (2.5M NH₄OAc, 50mM EDTA, 20µg/ml Hefe t-RNA) wurden die Proben je einmal mit Phenol/Chloroform und Chloroform extrahiert und mit 2.5 Volumina Ethanol gefällt (1 Stunde, Trockeneis).

2.10. "Primer-extension"-Reaktion (Gosh et al. 1980)

5µg polyA⁺-RNA wurden mit 0.05pmol 5'-endmarkiertem Oligonukleotid (siehe 2.4.5.) und 2µl 5x Puffer (2M NaCl, 50mM PIPES pH6.4) in einem Gesamtvolumen von 10µl für 6 Stunden bei einer Temperatur hybridisiert, die 10°C unter dem für das Oligonukleotid berechneten T_m-Wert lag (4°C x(G+C)+2°C x(A+T), Wallace et al. 1981).

Nach Zugabe von 90µl Transkriptions-Puffer (55.5mM Tris-HCl pH8.2, 11.1mM DTT, 6.66mM MgCl₂, je 555µM dNTP, 110 Einheiten/ml Reverse Transkriptase) wurde 60 min bei 42°C inkubiert. Die Probe wurde mit Phenol/Chloroform extrahiert, die Nukleinsäuren aus 0.3M NaOAc mit 2.5 Volumina Ethanol gefällt (10 min, Trockeneis) und abzentrifugiert (10 min, 12000 Upm, -10°C, SE12). Der Niederschlag wurde mit 70%igem Ethanol gewaschen, getrocknet und in 3µl Harnstoff-Probenpuffer (8M Harnstoff, 1x TEB, je 0.05% Bromphenolblau und Xylen Cyanol FF) gelöst.

2.11. Sonstige Methoden

2.11.1. Isolierung von λ-Phagen-DNA

Die Isolierung der DNA erfolgte nach der bei Maniatis et al. (1982) beschriebenen Methode.

2.11.2. Isolierung gesamtgenomischer DNA

Gesamtgenomische DNA wurde wie bei Brennan et al. (1984) beschrieben präpariert.

2.11.3. Synthese und Reinigung von Oligonukleotiden

Oligonukleotide wurden mit einem Pharmacia Gene Assembler hergestellt und säulenchromatographisch gereinigt (Mono Q HR 5/5). Folgende Oligonukleotide wurden synthetisiert:

P1: 5' ACGTGTGCCATTATGCAC 3'

P2: 5' GATCGTCTCGCCAGCGTCG 3'

P3: 5' AGCGATAAGAGTTCAGAGT 3'

5'-endmarkierte Oligonukleotide (siehe 2.5.4.) wurden wie bei Strauss et al. (1986) über Polyacrylamid-Gele und DE-52 Cellulose aufgereinigt.

2.11.4. TCA-Präzipitation von Nukleinsäuren

Die Lösung mit radioaktiv markierter DNA wurde mit 100µg Kalbsthymus-DNA versetzt und mit Wasser auf 50µl aufgefüllt. Nach Zugabe von 1ml 10%iger TCA-Lösung wurde 5min auf Eis inkubiert. Der Niederschlag wurde abzentrifugiert (Eppendorf-Tischzentrifuge), zweimal mit 5%iger TCA-Lösung gewaschen und getrocknet. Die Radioaktivitätsmenge wurde durch Messung der Cerenkov-Strahlung bestimmt.

2.11.5. Autoradiographie

Sequenziergele wurden auf Fuji RX oder Agfa Röntgenfilmen 12h bei Raumtemperatur exponiert.

Alle anderen Autoradiographien erfolgten mit vorsensibilisierten Röntgenfilmen (Laskey & Mills 1975) und Verstärkerfolie (Cronex Du Pont) bei -70°C.

2.11.6. Auswertung der DNA-Sequenzdaten

Die Nukleotidsequenzen wurden mit dem Micro Genie Sequenz-Analyse Programm (Queen & Korn 1984) ausgewertet.

3. Ergebnisse

3.1 Identifizierung von Transkripten

Zur Untersuchung der im Maternalen-Effekt-Bereich liegenden Gene wurde aus einem insgesamt 90 kbp umfassenden DNA-Block der in Abbildung 1 dargestellte Teilbereich analysiert.

Um vorhandene Transkripte zu identifizieren wurden "nick translatisierte"-DNA Fragmente des Mc λ -Phagen (Abb.1) an polyA⁺-RNA aus verschiedenen Entwicklungsstadien von *D. melanogaster* hybridisiert. Die Standardisierung der RNA-Mengen erfolgte durch eine Hybridisierung mit einem β 1-Tubulin cDNA-Klon (pTU56). Mit dieser cDNA wurde in allen Entwicklungsstadien eine 1.8kb RNA mit vergleichbarer Häufigkeit nachgewiesen (Bialojan et al. 1984).

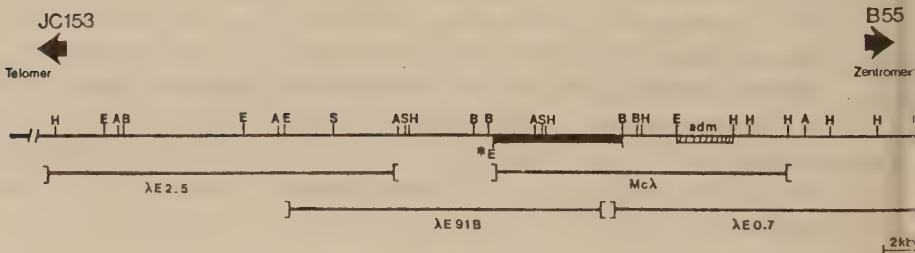


Abbildung 1: Übersichtskarte der genomischen DNA

Dargestellt ist die relative Orientierung der DNA zu den chromosomalen Bruchpunkten JC153 und B55 sowie die λ -Phagen die diesen Bereich überdecken mit den ermittelten Restriktions-Stellen (A, ApaI; B, BamHI; E, EcoRI; H, HindIII; S, SstI). Phagen, die mit einem M bezeichnet sind, wurden aus der CantonS-Bibliothek (Maniatis et al. 1978), die mit E bezeichneten Phagen aus einer OregonR Bibliothek (EMBL4A, Preiss et al. 1985) isoliert.

Angegeben sind die Positionen der zur Hybridisierung verwendeten Fragmente (6.5kbp EcoRI/BamHI, 3.6kbp EcoRI/HindIII-Fragment). Der Maßstab gibt die Länge in Kilobasenpaaren an.

Die abgebildeten Transkriptanalysen wurden von R. Müller (1986) zur Verfügung gestellt.

Abbildung 2A zeigt das Ergebnis der Hybridisierung mit einem 3.6kbp EcoRI/HindIII Fragment, das die zur adm134H4-cDNA (Wolfner 1980) komplementären Bereiche enthält. Transkripte mit Längen von 2.2 kb (adm-1) und 2.0 kb (adm-2) sind in allen untersuchten Stadien nachweisbar, jeweils mit einer deutlichen Erhöhung der Transkriptmenge in Oocyten und 0-4 Stunden Embryonen.

Mit dem 6.5kbp EcoRI/BamHI-Fragment hingegen sind vier RNAs nachweisbar, von denen drei eine deutliche Stadienspezifität zeigen (Abb.2B). Die 2.0kb RNA (T1) ist in allen untersuchten Stadien vorhanden, wobei eine erhöhte Transkriptmenge in 0-4 Stunden Embryonen sowie im frühen und späten 3. Larvenstadium zu beobachten ist. Die 2.2kb RNA (T3) ist in 0-4 Stunden Embryonen (Maximum der Transkriptmenge), späten Puppen und adulten Fliegen zu beobachten, während die 1.8kb RNA (T2) außer in Oocyten und 0-4 Stunden Embryonen in allen Stadien vorhanden ist, wobei die maximale Transkriptmenge im 3. Larvenstadium vorliegt. Zusätzlich ist im 3. Larvenstadium sowie mit einer erhöhten Transkriptmenge in frühen Puppen ein 1.0kb Transkript (T4) zu beobachten. In RNA aus den Köpfen adulter Fliegen sind die T1-, T2- und T4-RNA ebenfalls nachweisbar, während ein deutliches Signal für die T3-RNA nicht beobachtet wird.

Zusammengefaßt zeigen die Transkriptanalysen, daß im 6.5kbp EcoRI/BamHI-Fragment offensichtlich kodierende Bereiche für vier RNAs vorliegen, die sich hinsichtlich der Stadienspezifität deutlich von den im EcoRI/HindIII-Fragment nachweisbaren adm-Transkripten unterscheiden.

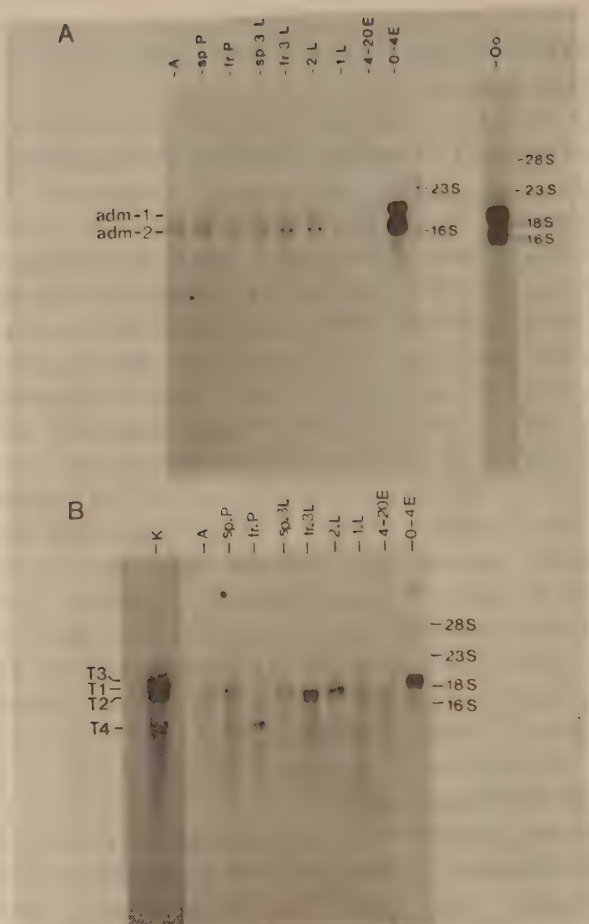


Abbildung 2: Hybridisierung genomischer Fragmente an stadienspezifische RNA

2µg polyA⁺-RNA der angegebenen Entwicklungsstadien (A, Adult; sp.P, späte Puppen; fr.P, frühe Puppen; sp.3L, spätes 3. Larvenstadium; fr.3L, frühes 3. Larvenstadium; 2.L, 2. Larvenstadium; 1.L, 1. Larvenstadium; 4-20E, 4-20 Stunden Embryonen; 0-4E, 0-4 Stunden Embryonen; Oo, Oocyten) und 5µg polyA⁺-RNA aus Köpfen adulter Fliegen (K) wurden auf 1.5%igen Formaldehyd/Agarosegelen aufgetrennt und auf eine Nylonmembran transferiert.

A: Hybridisierung mit 1.5×10^6 cpm/ml "nick translatiertem" 3.6 kbp EcoRI/HindIII Fragment (Spez. Aktivität 1.8×10^8 cpm/µg).
Belichtungszeit: 4.5 Tage.

B: Hybridisierung mit 3×10^6 cpm/ml "nick translatiertem" 6.5 kbp EcoRI/BamHI Fragment (Spez. Aktivität 2×10^8 cpm/µg).
Belichtungszeit 3 Tage.

Als Längenstandard wurde E.coli rRNA (16S, 23S) und rRNA aus Hela-Zellen (18S, 28S) verwendet.

3.2 Herstellung der cDNA-Bibliothek

3.2.1. RNA-Isolierung

Um eine Anreicherung neuronaler RNA-Spezies zu erreichen, wurde RNA aus Köpfen von adulten Fliegen isoliert.

Aus etwa 15000 Köpfen (ca. 3g Gewebe) wurden 3mg RNA isoliert, von der nach Fraktionierung auf einer oligo(dT)-Cellulose Säule insgesamt 56µg polyA⁺-RNA verblieben. Dies entspricht einer Ausbeute von 2% bezogen auf die gesamte RNA-Menge. Die Qualität der RNA-Präparation wurde auf einem denaturierenden 1.5%igen Agarosegel überprüft. Aus Abbildung 3A ist ersichtlich, daß die polyA⁺-RNA keine sichtbaren Mengen ribosomaler RNA enthielt. Eine Kontamination mit hochmolekularer DNA wurde ebenfalls nicht beobachtet.

3.2.2. Synthese der einzel- und doppelsträngigen cDNA

In Abbildung 4 sind die zur Herstellung der cDNA-Bibliothek im einzelnen durchgeführten Syntheseschritte schematisch dargestellt. Die Synthese der einzelsträngigen cDNA erfolgte unter den von Koerwer (1983), für RNA aus Speicheldrüsen von *Drosophila melanogaster*, beschriebenen Bedingungen (siehe 2.3.1.). In Vorexperimenten wurde der Einfluß der K-Konzentration auf die Ausbeute und Länge der synthetisierten cDNA untersucht. Im untersuchten Konzentrationsbereich (30mM bis 90mM KCl) wurde ein Längenoptimum zwischen 40mM und 70mM KCl gefunden. Für die folgenden Synthesen wurde eine K-Konzentration von 50mM gewählt. Unter diesen Bedingungen wurden mit 80-100µg/ml polyA⁺-RNA im Reaktionsansatz Syntheseausbeuten von etwa 25% - bezogen auf die eingesetzte RNA-Menge - erreicht.

Die Synthese der doppelsträngigen cDNA wurde analog zu der von Gubler & Hoffman (1983) beschriebenen Methode durchgeführt (siehe 2.3.2.).

Die einzelnen Schritte der cDNA-Synthese wurden in Ansätzen, die zusätzlich ein radioaktives Nukleotid enthielten, kontrolliert. Die Syntheseausbeuten wurden über die mit TCA fällbare Radioaktivität ermittelt, die Längenbestimmung der Synthese-Produkte erfolgte auf 6% Polyacrylamid/8M Harnstoffgelen.

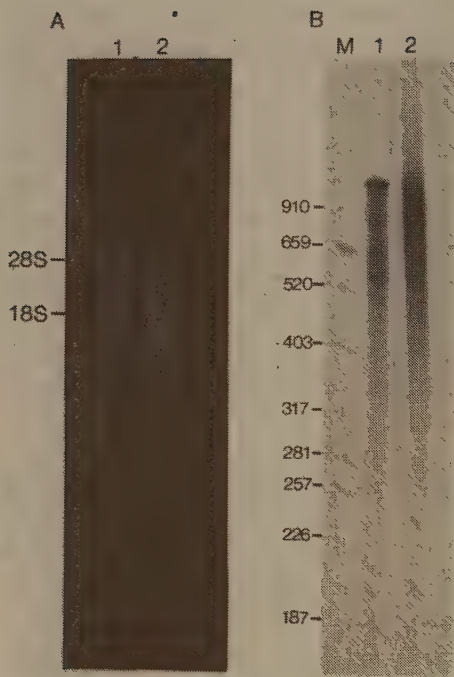


Abbildung 3:

- A: 1µg polyA⁺-RNA (Bahn 2) aus Köpfen von adulten *D.melanogaster* und 1µg HeLa-rRNA (Bahn 1) wurden auf einem 1.5%igen Methylquecksilber/Agarosegel aufgetrennt.
- B: Aus zwei identischen Ansätzen mit jeweils 2µg Kopf-polyA⁺-RNA wurde wie in 2.3.2. beschrieben einzelsträngige cDNA synthetisiert. Der erste Ansatz enthielt zusätzlich 50µCi α-³²P-dATP. Die Synthese der doppelsträngigen cDNA erfolgte mit dem zweiten Ansatz wie in 2.3.2. beschrieben unter Zugabe von 50µCi α-³²P-dATP. Jeweils 1/25 der Syntheseansätze wurden auf einem 6% Polyacrylamid/8M Harnstoffgel analysiert.
- Bahn 1 : einzelsträngige cDNA.
- Bahn 2 : doppelsträngige cDNA
- Bahn M : ³²P-endmarkierte AluI-Restriktionsfragmente des Plasmids pYH48 (Silvermann et al. 1979). Die Zahlen geben die Fragmentlänge in Nukleotiden an.

Aus Abbildung 3B ist ersichtlich, daß eine vergleichbare Längenverteilung zwischen 500-1500 Nukleotiden für die einzel- und doppelsträngige cDNA erhalten wurde.

Zur Herstellung der cDNA-Bibliothek wurden, ausgehend von zehn identischen Ansätzen mit je 2µg polyA⁺-RNA, etwa 5µg einzelsträngige cDNA synthetisiert. Die gesamte Menge wurde zur Synthese der doppelsträngigen cDNA eingesetzt. Aus diesem Syntheseschritt wurden insgesamt 4µg doppelsträngige cDNA erhalten, was einer Ausbeute von etwa 80%, bezogen auf die eingesetzte einzelsträngige cDNA, entspricht.

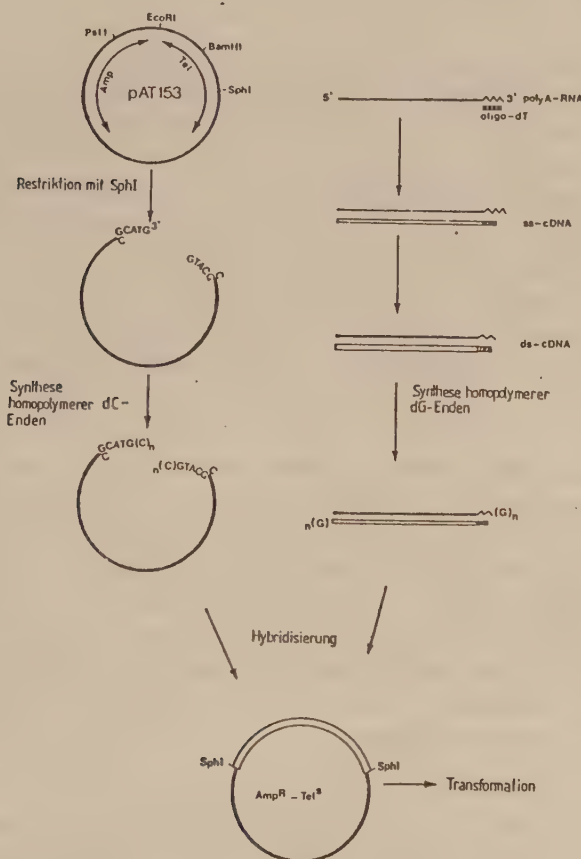


Abbildung 4: Schematische Darstellung der cDNA-Klonierung

3.2.3. Präparation des Klonierungsvektors

Als Klonierungsvektor wurde pAT 153 verwendet, der im Vergleich mit pBR 322 eine 2-3fach erhöhte Kopienzahl pro Bakterienzelle aufweist (Twigg & Sherrat 1980).

An Stelle der von Gubler und Hoffman (1983) zur Klonierung verwendeten EcoRV-Restriktionsschnittstelle (stumpfe Enden) wurde aufgrund folgender Vorteile die SphI-Schnittstelle (3'-überhängende Enden) gewählt :

1) Die Synthese homopolymerer dC-Reste an 3'-überhängende DNA-Enden verläuft effizienter als für 3'-rezessive oder stumpfe Enden (Deng & Wu 1981).

2) Durch die Klonierung von doppelsträngiger cDNA, deren Enden homopolymere dG-Reste aufweisen, in eine mit homopolymeren dC-Enden versehene SphI-Stelle wird die ursprüngliche SphI-Sequenz wieder hergestellt, so daß die insertierte cDNA durch Restriktion mit SphI isoliert werden kann. Bei einer entsprechenden Klonierung in die EcoRV-Stelle wird eine singuläre BamHI-Stelle generiert. Die insertierte cDNA läßt sich unter Verwendung der im Vektor liegenden BamHI-Stelle mit diesem Enzym ausschneiden, enthält aber zusätzlich 186bp der Vektor-DNA, wodurch die Verwendung des cDNA-Fragments für Hybridisierungsexperimente eingeschränkt ist.

Präparativ isolierte pAT153-DNA (siehe 2.7.1.) wurde durch Restriktion mit SphI linearisiert. Zur Abtrennung des nicht-linearisierten Plasmids wurde der Restriktionsansatz auf einem niedrig schmelzenden Agarosegel fraktioniert und die Bande der linearen DNA aus dem Gel extrahiert (siehe 2.7.3). Mit diesem aufgereinigten Vektor wurde eine 10-15%ige Reduzierung des Transformationshintergrundes erzielt. Die Transformationsrate in E. coli C600 betrug 500-800 Kolonien pro μg des aufgereinigten linearen Vektors. Mit dem zirkulären Plasmid wurden $1-5 \times 10^6$ Kolonien/ μg erhalten.

3.2.4. Synthese homopolymerer Enden

Die Längen der homopolymeren Enden des Vektors und der cDNA sind ein wesentliches Kriterium für eine optimale Hybridisierung und den daraus resultierenden Transformationsraten. Die von Peacock et al. (1981) ermittelten Werte zeigen ein Transformationsmaximum für 20 dG- und 15 dC-Reste.

Die Addition homopolymerer (dG)-Reste an doppelsträngige cDNA wurde wie bei Gubler & Hoffman (1983) beschrieben durchgeführt (siehe 2.3.3.3.). Unter diesen Bedingungen verläuft die Reaktion selbst-limitierend und bricht nach der Addition von etwa 20-25 dG-Nukleotiden ab (Michelson & Orkin 1982).

Die Synthese homopolymerer dC-Reste an den SphI-linearisierten Vektor erfolgte nach der unter 2.3.3.2. beschriebenen Methode.

In den Synthesen, die mit einem 2000fachen molaren Überschuß von dCTP gegenüber den vorhandenen 3'-Enden durchgeführt wurden (Abb. 5A), erfolgt die Addition der Nukleotide äußerst schnell, innerhalb eines Zeitintervalls von 0-3 Minuten wurden etwa 25-30 Nukleotide ansynthetisiert. Die Effizienz der Reaktion war jedoch mit 40-45% modifizierter Enden relativ niedrig. Durch eine Verlängerung der Reaktionszeit konnte die Effizienz zwar erhöht werden, die dC-Reste zeigten jedoch eine sehr ungünstige Längenverteilung, teilweise bis zu einer Länge von 150 Nukleotiden.

Abbildung 5B zeigt die Kinetik der Synthese bei einem molaren dCTP/3'-Enden Verhältnis von 45:1. Durch diese Reduzierung der Nukleotid-Konzentration wurden durchschnittliche Längen von 15-25 dC-Resten erst nach einer Reaktionszeit von 50-60 Minuten erreicht. Die Ausbeute an "getailten" Enden wurde nach 50 Minuten zu 80% bestimmt.

3.2.5. Klonierung

Um die optimalen Transformationsraten zu ermitteln wurden verschiedene Mengen des dC-"getailten" Vektors mit dG-"getailter" cDNA hybridisiert. In Hybridisierungsansätzen mit Vektor/cDNA-Gewichtsverhältnissen von 25:1, die maximal 0.5µg/ml DNA ent-

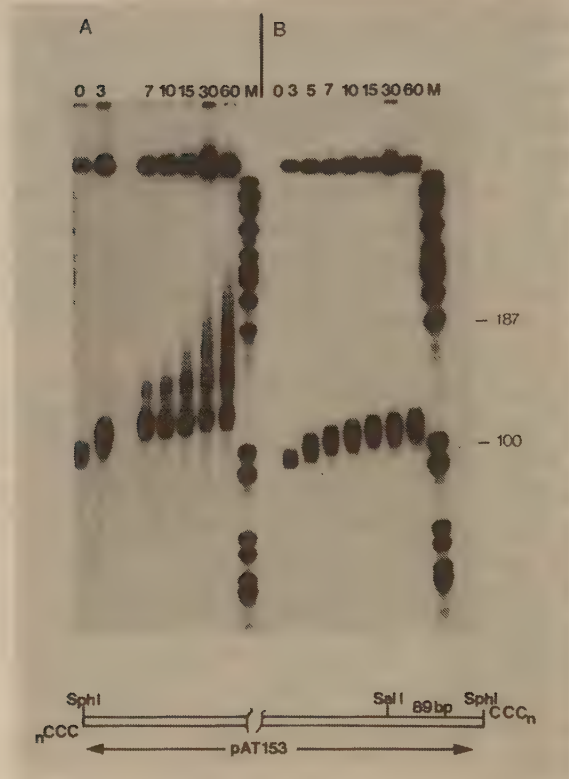


Abbildung 5:

Die Synthese homopolymerer dC-Reste erfolgte in 20 μ l Ansätze mit jeweils 10 μ g SphI linearisierter pAT153-DNA (8.4 pmol 3'-Enden) wie in 2.3.3. beschrieben mit molaren Verhältnissen von dCTP:3'-Enden von 2000:1 in A und 45:1 in B.

Nach den angegebenen Zeiten (Minuten) wurden den Ansätzen 2 μ l entnommen, mit 10 μ l Wasser versetzt und 10' bei 65°C inkubiert. Nach Restriktion mit SalI (1 Stunde, 37°C) wurde die DNA ethanolgefällt und auf einem 6% Polyacrylamid Harnstoff-Gel aufgetrennt. Die Länge der ansynthetisierten dC-Reste wurde der Verlängerung des 89bp SalI/SphI Fragments ermittelt. Als Längenstandard wurde pYH48/AluI verwendet (Bahn M).

hielten (Peacock et al. 1981), wurden die höchsten Ausbeuten an Transformanten erzielt, in der Regel 500-700 Kolonien/ng cDNA. Der Transformationshintergrund betrug durchschnittlich 5-10%.

Zur Herstellung von 10 Filtern der cDNA-Bibliothek mit jeweils 5000-7000 Transformanten, wurden insgesamt 2.5µg Vektor und 100ng cDNA verwendet.

3.3. Isolierung und Charakterisierung von cDNA-Klonen.

3.3.1. Isolierung von cDNA-Klonen

Zur Isolierung von cDNA-Klonen, die den in 3.1. nachgewiesenen Transkripten entsprechen, wurden neben der "Kopf"-cDNA-Bibliothek (siehe 3.2.) λ gt10 cDNA Bibliotheken aus RNA von 0-4h Embryonen bzw. Larven des 3. Häutungsstadiums verwendet (siehe 2.4.).

Jeweils fünf Replika-Filter (etwa 75000 Rekombinanten) aus beiden Bibliotheken wurden mit dem "nick-translatierten" 6.5kbp EcoRI-BamHI Fragment (siehe 3.1.) hybridisiert. Die aus der jeweiligen Bibliothek erhaltenen positiven Phagen (20 Signale in der larvalen Bibliothek, 6 Signale in der embryonalen Bibliothek) wurden gemischt und zur Vereinzelung ausplattiert. Nach erneuter Hybridisierung wurden zehn positive Phagen aus der larvalen Bibliothek für die weiteren Untersuchungen ausgewählt.

Isolierte Phagen-DNA wurde mit EcoRI verdaut und die Länge des insertierten cDNA-Fragments gelelektrophoretisch bestimmt. Sieben Phagen enthielten ein etwa 1.5 kbp Fragment, weitere drei Phagen ein 1.3 kbp Fragment. Aus jeder Gruppe wurde ein Phage (λ gt10-1.5, λ gt10-1.3) für die folgenden Untersuchungen ausgewählt.

Aus etwa 70000 Rekombinanten (10 Filter) der "Kopf"-cDNA Bibliothek wurden unter den gleichen Bedingungen sechs positive Signale erhalten. Die Kolonien wurden gemischt, verdünnt ausplattiert und erneut hybridisiert. Dies führte zur Identifizierung eines positiven Klons (pc7-90).

3.3.2. Restriktionsanalyse

Die cDNA-Fragmente der λ gt10-1.5 und λ gt10-1.3 Phagen wurden in pAT153 umklontiert. Die resultierenden Plasmide pgt1.5 und pgt1.3 sowie das aus der "Kopf"-cDNA Bibliothek isolierte Plasmid pc7-90 (Abb.6A) wurden durch Restriktion mit verschiedenen Endonukleasen analysiert (Abb.6B). Die ermittelten Restriktionskarten der cDNA-Fragmente sind in Abb.6C dargestellt.

Durch Hybridisierung der cDNA-Fragmente gegeneinander wurde eine Kreuzhomologie zwischen pgt1.5- und pgt1.3-cDNA gefunden und somit auf eine weitgehende Identität der beiden Klone geschlossen. Aufgrund der Restriktionskarte wurde eine überlappende Anordnung der Klone über ein in beiden cDNA-Fragmenten vorhandenes 0.18kbp BamHI/XhoI-Fragment ermöglicht.

Der pc7-90-Klon repräsentiert eine unabhängige cDNA, da nach den Ergebnissen der Hybridisierung keine Homologien zu pgt1.5 und pgt1.3 vorhanden sind.

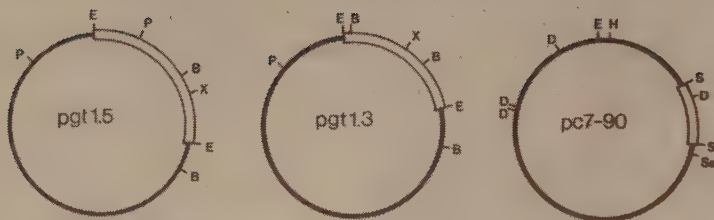
3.3.3. Bestimmung des kodierenden DNA-Strangs.

Die in Abbildung 7A dargestellten Plasmide, die das pgt1.5-cDNA-Fragment in jeweils unterschiedlichen Orientierungen enthielten wurden präparativ isoliert (siehe 2.7.1.) und zur in vitro-Transkription (Krieg & Melton 1984; Melton et.al. 1984) eingesetzt. Die synthetisierten einzelsträngigen RNA-Proben wurden an RNA-Blots mit identischen Mengen an polyA⁺-RNA hybridisiert.

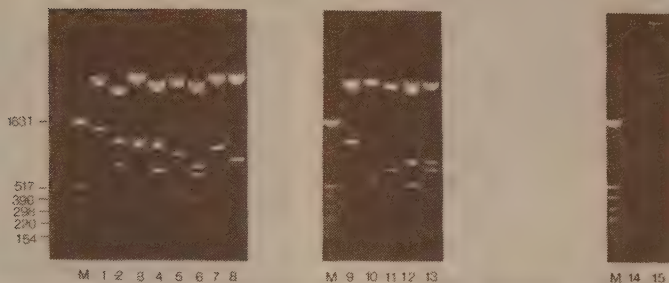
Der codogene DNA-Strang wird durch die von pSP64/A transkribierte RNA repräsentiert, da ausschließlich mit dieser Probe ein Hybridisierungs-Signal erhalten wird (Abb.7B). Zudem ist ersichtlich, daß gleichzeitig zwei Transkripte mit der pgt1.5-Probe identifiziert werden, so daß für diese RNAs eine ausgeprägte Homologie untereinander vermutet werden mußte.

Das cDNA-Fragment aus pc7-90 wurde in beiden Orientierungen in den M13mp19-Polylinker kloniert. Von beiden Plasmiden (Abb.8A) wurde einzelsträngige DNA hergestellt (siehe 2.8.1.) und an RNA-Blots hybridisiert. Der Nachweis der an die RNA hybridisierenden

A



B



C

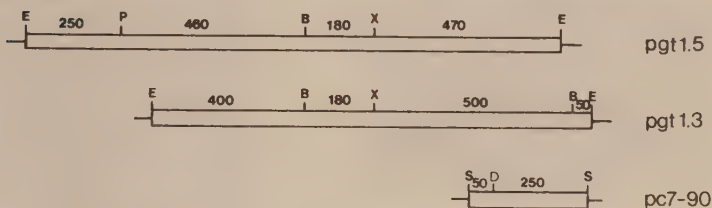


Abbildung 6: Konstruktion und Restriktionsanalyse der cDNA-Plasmide

A: Ausgehend von λ gt10-1.5 und λ gt10-1.3 wurden die cDNA-Fragmente durch Restriktion mit EcoRI isoliert und in pAT153 subkloniert.
Restriktionsstellen: E, EcoRI; B, BamHI; D, DraI; H, HindIII; P, PstI; S, SphI; Sa, Sall; X, XhoI.

B: Die Plasmid-DNA wurde mit den angegebenen Restriktions-Enzymen verdaut und auf 1.5% Agarosegelen aufgetrennt. Die einzelnen Bahnen enthalten:

- | | |
|------------------------|-------------------------|
| 1 pgt1.5 / EcoRI | 9 pgt1.3 / EcoRI |
| 2 pgt1.5 / EcoRI/PstI | 10 pgt1.3 / EcoRI/XhoI |
| 3 pgt1.5 / PstI | 11 pgt1.3 / EcoRI/BamHI |
| 4 pgt1.5 / PstI/XhoI | 12 pgt1.3 / BamHI/XhoI |
| 5 pgt1.5 / EcoRI/XhoI | 13 pgt1.3 / BamHI |
| 6 pgt1.5 / EcoRI/BamHI | |
| 7 pgt1.5 / BamHI | 14 pc7-90 / DraI |
| 8 pgt1.5 / BamHI/XhoI | 15 pc7-90 / SphI |

Als Längenstandard (Bahn M) wurde pAT153/HinfI verwendet

C: Restriktionskarte der cDNA-Fragmente

Die Zahlen geben die ermittelten Fragmentlängen in Basenpaaren an. Die Bezeichnung der Restriktionsstellen erfolgte wie in A angegeben.

einzelsträngigen DNA erfolgte durch eine zweite Hybridisierung mit "nick-translatierter" M13mp19RF-DNA (siehe 2.6.3.).

Ausschließlich mit dem F1-Plasmid wurde eine Hybridisierung erhalten (Abb 8B). Das in dieser Orientierung enthaltene DNA-Fragment repräsentiert somit den codogenen DNA-Strang.

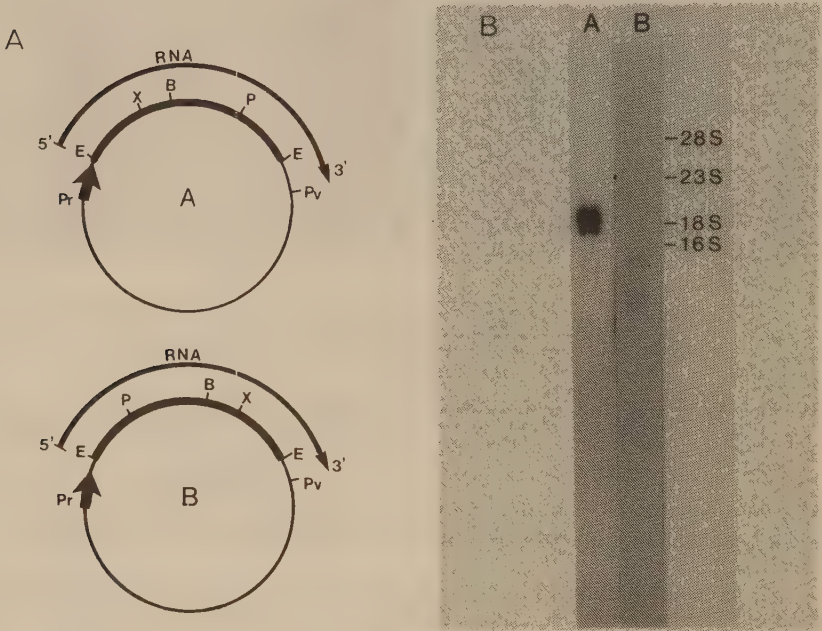


Abbildung 7: Kodierender pgt1.5 DNA-Strang

A: Ausgehend von pgt1.5 wurde das cDNA-Fragment in beiden Orientierungen in die EcoRI-Stelle des pSP64-Plasmids kloniert. Die resultierenden Plasmide pSP64-A und pSP64-B wurden mit PvuII linearisiert und zur *in vitro*-Transkription eingesetzt (2.5.3.)

(Pr., SP6-Promotor; E, EcoRI; B, BamHI; P, PstI; Pv, PvuII; X, XhoI)

B: Je 2µg polyA⁺-RNA (3. Larvenstadium) wurden auf Formaldehyd/Agarose-gelen fraktioniert und auf Nylonmembranen überführt. Die Hybridisierung (2.6.3.) erfolgte mit 5×10^6 cpm/ml der von pSP64-A (Bahn A) und pSP64-B (Bahn B) synthetisierten RNA (spez. Aktivität 8×10^6 cpm/µg).

Belichtungszeit: 14 Stunden

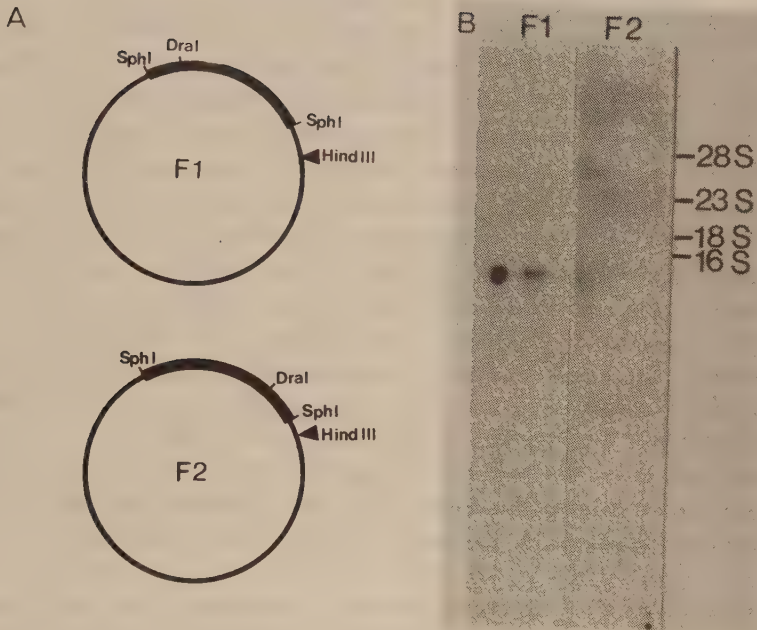


Abbildung 8: Kodierender pc7-90 DNA-Strang

A: Ausgehend vom pc7-90 Plasmid wurde das cDNA-Fragment in beiden Orientierungen in die SphI-Stelle des M13mp18-Polylinker kloniert. Die Orientierung wurde durch Restriktion mit DraI/HindIII bestimmt.

B: Je 2µg polyA⁺-RNA (Adult) wurden auf einem Formaldehyd/Agarosegel fraktioniert und auf Nylonmembranen überführt. Die Blots wurden mit 0.5µg/ml unmarkierter einzelsträngiger F1- und F2- DNA hybridisiert (2.6.3.). Nach dem Abwaschen der Proben erfolgte eine zweite Hybridisierung mit 5x10⁶ cpm/ml "nick translatierter" M13mp18RF-DNA (spez. Akt. 4x10⁸ cpm/µg). Belichtungszeit: 2 Tage

3.3.4. Nukleotidsequenz der cDNA-Fragmente.

Zur Ermittlung der Nukleotidsequenzen wurden die cDNA-Fragmente in M13-Vektoren umklontiert und nach der Dideoxy-Strangterminations-Methode (Sanger et al. 1977) sequenziert.

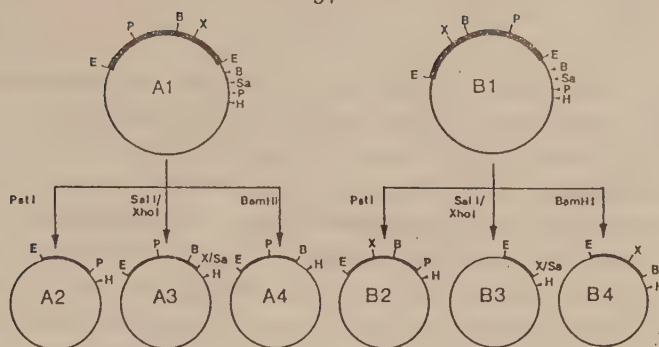
Zur Sequenzierung der pgt1.5 und pgt1.3 cDNA-Fragmente wurden die vollständigen Fragmente in jeweils beiden möglichen Orientierungen subklontiert, so daß eine Sequenzierung von etwa 200 Nukleotiden der endständigen Bereiche durchgeführt werden konnte. Um die Sequenzen der intern liegenden Bereiche zu bestimmen, wurden unter Verwendung der in 3.3.2. ermittelten Restriktionsstellen, die Klone, die das vollständige Fragment enthielten, mit entsprechenden Endonukleasen verdaut. Das entstehende Fragment wurde über ein Agarosegel vom verbleibenden Vektor, der noch Restbereiche des gesamten Fragments enthielt, abgetrennt. Der Vektor wurde anschließend religiert und die entsprechende rekombinante Einzelstrang-DNA sequenziert. Die Konstruktion der im einzelnen verwendeten M13-Klone ist in Abb.9A und 9B dargestellt.

Die vollständigen Nukleotidsequenzen für das pgt1.5 (Abb.10A) und für das pgt1.3 cDNA-Fragment (Abb.10B) wurden nach der in den Abbildungen schematisch dargestellten Strategie ermittelt.

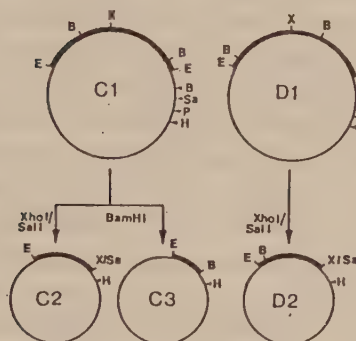
Aus einem Vergleich der cDNA-Nukleotidsequenzen (Abb.10A und B) war ersichtlich, daß beide Fragmente einen über 910 Nukleotide verlaufenden identischen Bereich aufweisen (Nukleotide 455 bis 1364 in pgt1.5 und 128 bis 1038 in pgt1.3). Die Nukleotide 1-127 in pgt1.3 und 1-454 in pgt1.5 weisen hingegen keine Homologie auf. Aus diesem Ergebnis konnte geschlossen werden, daß offensichtlich beide cDNAs von verschiedenen mRNAs stammen.

Für beide cDNAs wurde ein durchgehender, offener Leserahmen gefunden, wobei trotz der unterschiedlichen 5'-Enden die Aminosäuresequenz innerhalb der 910bp-Homologie identisch ist. Der Leserahmen endet in der pgt1.3-Sequenz, die gegenüber pgt1.5 um etwa 70bp am 3'-Ende verlängert ist, an einem Terminations-Signal (Nukleotide 1092-1094, Abb.10B). Die Sequenz GATAAA (Nukleotide 1109-1114) stellt ein mögliches Polyadenylierungssignal dar,

A



B



C

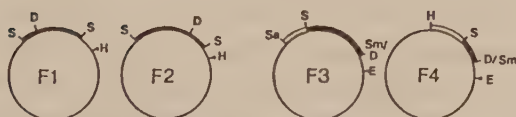


Abbildung 9: Konstruktion der M13-Plasmide

A: Das *pgt1.5* cDNA-Fragment wurde in beiden Orientierungen in die *EcoRI*-Restriktionsschnittstelle des M13mp18-Polylinker kloniert. Die isolierte RF-DNA A1 und A2 wurde mit den angegebenen Restriktionsenzymen geschnitten und auf niedrig schmelzenden Agarosegelen fraktioniert. Die verkürzten Plasmide wurden religiert und erneut transformiert. Die experimentellen Details sind unter 2.7. beschrieben.

B: Klonierung des *pgt1.3*-cDNA Fragments in M13mp18RF.
Die Durchführung erfolgte wie unter A) beschrieben.

C: Die Konstruktion der Plasmide F1 und F2 ist in Abb.8A beschrieben. Die Konstruktion von F3 erfolgte durch die Klonierung des 0.37kb *SalI*/*DraI* Fragments aus *pc7-90* in M13mp19 *SalI*/*SmaI*. Das *pc7-90* *HindIII*/*DraI*-Fragment (0.56kbp) wurde zur Konstruktion von F4 in M13mp19 *SmaI*/*HindIII* kloniert.

(B, BamHI; D, DraI; E, EcoRI; H, HindIII; P, PstI; S, SphI; Sa, SalI; Sm, SmaI; X, XhoI)

weicht allerdings von den beschriebenen Konsensus-Sequenzen ab (AATAAA oder CAPyTG, Proudfoot 1984; Birnstiel et al. 1985).

Zur Ermittlung der pc7-90 Sequenz wurden ursprünglich die bereits zur Bestimmung des codierenden Strangs konstruierten M13-Klone F1 und F2 (Abb.9C) verwendet (siehe 3.3.3.), da aufgrund der geringen Länge des pc7-90-Fragments von etwa 300bp durch die Sequenzierung von etwa 200bp der beiden Endbereiche eine Bestimmung der gesamten Sequenz einschließlich eines überlappenden Bereichs möglich war. Bedingt durch die zur Herstellung der cDNA-Bibliothek verwendete Methode (siehe 3.2.) weisen die Enden des cDNA-Fragments homopolymere Bereiche auf. Insbesondere sind auf dem zu sequenzierenden Strang Bereiche vorhanden die ausschließlich aus dG-Nukleotiden bestehen. In den unter Standardreaktionsbedingungen (siehe 2.8.) durchgeführten Sequenzierungen wurden extreme Bandenkompressionen beobachtet, die eine exakte Auswertung der Sequenzen nicht zuließen. Auch durch eine Erhöhung der Reaktionstemperatur auf 50°C wurden die Ergebnisse nicht derart verbessert, daß die Sequenzen mit Sicherheit bestimmt werden konnten. Aus diesem Grund wurden zusätzlich die in Abbildung 9C dargestellten Klone F3 und F4 konstruiert, die eine Sequenzierung von der internen DraI-Restriktionsschnittstelle ermöglichten.

Die so ermittelte Nukleotidsequenz des pc7-90 cDNA-Fragments (Abb. 10C) enthält keinen durchgehenden, offenen Leserahmen, lediglich eine am 3'-Ende vorhandene Nukleotidsequenz (Nukleotide 258-263, Abb.10C), die ein mögliches Polyadenylierungs-Signal darstellt. Die pc7-90 cDNA repräsentiert somit vermutlich RNA-Bereiche der 3'-nicht-translatierten Region.

Abbildung 10 Nukleotidsequenzen der cDNA-Fragmente

Angegeben sind die Länge und Richtung der im einzelnen durchgeführten Sequenzierungen. Die Bezeichnungen über den Pfeilen beziehen sich auf die in Abb.9 dargestellten M13-Plasmide.

Dargestellt ist die Nukleotidsequenz des codierenden DNA-Strangs (=RNA).

A: pgt1.5 cDNA

B: pgt1.3 cDNA

C: pc7-90 cDNA

Die in A und B unterstrichene Nukleotidsequenz bezeichnet die zwischen pgt1.5 und pgt1.3 identischen Bereiche.

Angegeben sind die Positionen der Restriktionsschnittstellen sowie der Beginn (→) und das Ende (↓) des jeweils gefundenen offenen Leserahmens.

A

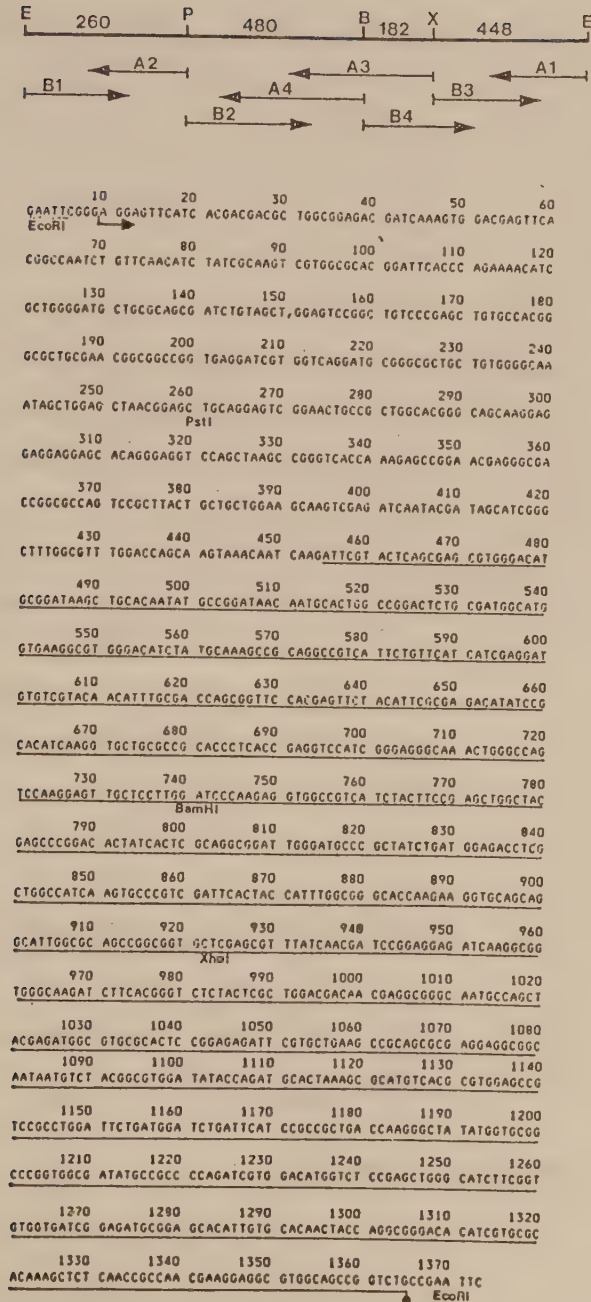
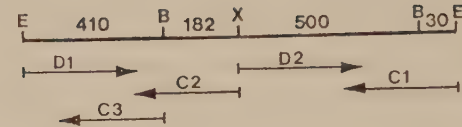


Abbildung 10

B



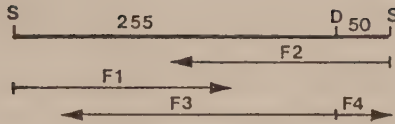
```

GAATTCGGGA TCGCGGCGC CGTGCATAAT GGCACACGTG TCCGAGGGCT GTGCGATAAA
EcoRI      70      80      90      100      110      120
GCAGGTCCGAG ATCAACACGG TGCCCTAGT TTGCTGGCA TAGCCACCAA TTGGTGCCEG
130      140      150      160      170      180
AGCAGAAATT CGTACTCAGC GAGCGTGGGA CATCGCGATA AGCTGCACAA TATGCCGGAT
190      200      210      220      230      240
AACAAATGCAC TGCCCGGACT CTGCGATGGC ATGGTGAAGG CGTGGGACAT CTATGCAAAG
250      260      270      280      290      300
CCGCGAGCCG TCATTCTGTT CATCATCGAG GATGTGTCTT ACAACATTTC CGACCAACGG
310      320      330      340      350      360
TTCCACGAGT TCTACATTCG CGAGACATAT CCGCACATCA AGGTGCTGCG CCGCACCCTC
370      380      390      400      410      420
ATCCAGATCC ATCGGGAGGG CAACCTGGCC CAGTCCAGGG AGTGTCTCTT TGGATCCCAA
430      440      450      460      470      480
GAGGTGGCCG TCATCTACTT CCGAGCTGGC TACGAGCCCG GACACTATCA CTGCGAGCCG
BamHI
490      500      510      520      530      540
GATTGGGATG CCGCTATCT GATGGAGACC TCGCTGGCCA TCAAGTGCCG GTCGATTAC
550      560      570      580      590      600
TACCATTTGG CGGGACCAA GAAGGTGCAG CAGGCAATTGG CGCAGCCCGC GGTGCTCGAG
XhoI
610      620      630      640      650      660
CGTTTATCAA CGATCCGGAG GAGATCAAGG CGGTGGGCAA GATCTTCAGC GGTCTCTACT
670      680      690      700      710      720
CGCTGGACGA CAACGAGGCG GGCAATGCCA GCTACGAGAT GGCCTGCGCA CTCGGGAGAG
730      740      750      760      770      780
ATTCTGTCTG AAGCCGACGC GCGAGGAGGC GGCAATAATG TCTACGGCGT GGAATCTGAT
790      800      810      820      830      840
GATGCACTAA AGCGCATGTC ACGCGTGGAG CCGTCCGCTT GGATTCIGAT GGAICTGATT
850      860      870      880      890      900
CATCCGCGCG TGACCAAGGG CTATAIGGTG CGGCCCGGTG GCGATATGCC GCCCCAGATC
910      920      930      940      950      960
GTGGACATGG TCTCCGAGCT GGGCACTTTC GGTGTGGTGA TCGGAGATGC GGAGCACATT
970      980      990      1000      1010      1020
GTGCACAACCT ACCAGGCGGG ACACATCGTG CGCACAAAGC TCTCAACCGC CAACGAAGGA
1030      1040      1050      1060      1070      1080
GGCGTGGCAG CCGGTCTGGG CGCCTTGGAC AGTCCATATC TGATCGATAG CGATGACGAG
1090      1100      1110      1120
GATGAGCAGA AGTAGGATCC TTTAACGAGA TAAAGTTCGC CGAATTC
BamHI      EcoRI

```

Abbildung 10 (Fortsetzung)

C



```

      10      20      30      40      50      60
GCATGCCCC CCCCCCCC CGTTTGGG CAAATGGGG TAGCTTAC TCGTTGGAA
SphI
      70      80      90     100     110     120
GGTACGGAGC TTGTTTGAGA AGTTTGGCAG CGCGGATGGC GGCAAAGTGA CCGTGGTAA

      130     140     150     160     170     180
CGGACTAGAT GGAATGCATA TTTAGATGAT CGCTATAGGT ACAAATCGG CTTAAGTTAT

      190     200     210     220     230     240
CGAATGGATG GAAGAGGGAG TTTGGTTAAA TCGGTTTAAG ACGCTGCGAA GCGAAACGAT

      250     260     270     280     290     300
GTTGAGCCCT CTCTTTAAAT AAATGTTGAA TCTTGACTTC TGAACACCAG GGGGGGGGGG
                        DraI
      310
GGGGCATGG
SphI
  
```

Abbildung 10 (Fortsetzung)

3.4. Charakterisierung von Transkripten

3.4.1. Transkriptgröße und relative Transkripthäufigkeit

Zur Charakterisierung der cDNA-zugehörigen RNAs wurden "Northern Blot"-Analysen durchgeführt. Aufgrund der Sequenzhomologie zwischen pgt1.5- und pgt1.3-cDNA (siehe 3.3.4.) wurden diese Analysen lediglich mit pgt1.5 durchgeführt. Eine Standardisierung der RNA-Mengen erfolgte über die Hybridisierung mit einem β -Tubulin cDNA-Klon (siehe 3.1.).

Durch Hybridisierung des "nick translatierten" pgt1.5 cDNA-Fragments an polyA⁺-RNA verschiedener Entwicklungsstadien wurden RNAs identifiziert (Abb.11A), die hinsichtlich der Größe und Transkripthäufigkeit in den untersuchten Stadien identisch sind mit den im EcoRI/BamHI-Fragment beobachteten T1-, T2- und T3-RNAs (Abb.2B). Zusätzlich zeigt diese Analyse, daß neben der Akkumulation der T1- und T3-RNA in 0-4 Stunden Embryonen beide Transkripte bereits in Oocyten vorhanden sind und somit maternalen Transkripten entsprechen.

Ein völlig anderes Ergebnis wurde durch die Hybridisierung mit dem pc7-90 cDNA-Klon erhalten (Abb.11B). Eine RNA (T7) mit einer Größe von 0.9 - 1.0kb ist in Oocyten nachweisbar, in Embryonen (4-20 Stunden) bereits nicht mehr vorhanden. Um eine mögliche neuronale Spezifität der T7-RNA nachzuweisen, wurde für das adulte Entwicklungsstadium RNA aus Kopf und Abdomen getrennt analysiert. In allen Fällen ist die T7-RNA nachweisbar. Ein Vergleich der Transkripthäufigkeit war nicht möglich, da die anschließende Hybridisierung mit einer β 1-Tubulin cDNA (siehe 3.1.) zeigte, daß unterschiedliche RNA-Mengen für diese Blots verwendet wurden.

Die abgebildeten Transkriptanalysen wurden von R. Müller (1986) und K. Weber (1986) zur Verfügung gestellt.

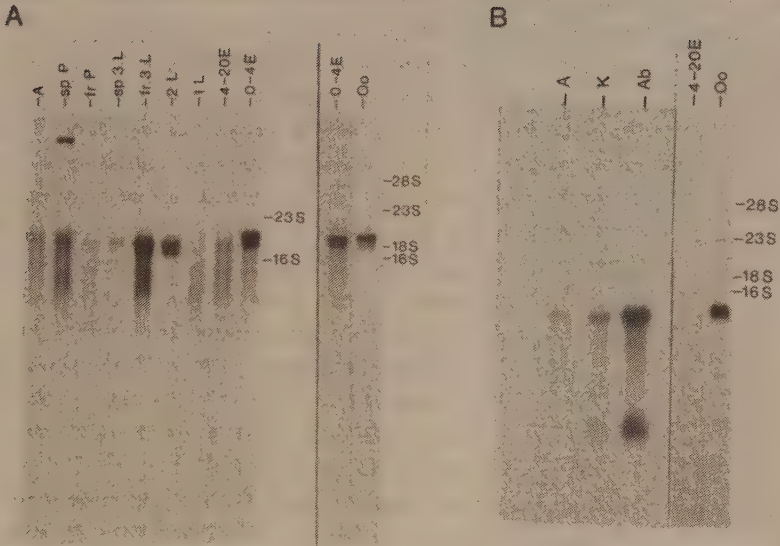


Abbildung 11

2µg polyA⁺ der angegebenen Entwicklungsstadien (Bezeichnung wie in Abb.2 , Ab,Abdomen) wurden auf Formaldehyd/Agarosegelen fraktioniert und auf Nylonmembranen transferiert.

A: Hybridisierung mit 1.5×10^6 cpm/ml "nick translatiertem" pgt1.5-Plasmid (Spez. Akt. 1.6×10^8 cpm/µg).
Belichtungszeit: 2 Tage

B: Hybridisierung mit 0.5µg/ml einzelsträngiger F1-DNA (Abb.9C) und Nach-hybridisierung mit 5×10^6 cpm/ml "nick translatierter" M13mp18RF-DNA (Spez. Akt. 4×10^8 cpm/µg).
Belichtungszeit: 2.5 Tage

3.4.2. Transkript-Spezifität der pgt1.5 cDNA

Das Vorhandensein nicht homologer Bereiche in pgt1.5 und pgt1.3 (siehe 3.3.4) zeigt, daß die beiden cDNA Klone von zwei verschiedenen mRNAs stammen müssen. Um zu untersuchen inwieweit eine Zuordnung zu einem der Transkripte für den Bereich der pgt1.5-cDNA möglich ist, der keine Homologie zur pgt1.3-Nukleotidsequenz aufweist (Nukleotide 1-454, Abb.10A), wurde das pgt1.5 cDNA-Fragment in pSP64 kloniert. Ausgehend von diesem Plasmid (pSP64-A) wurden wie in Abbildung 12A dargestellt, zwei Plasmide mit verkürzten cDNA-Fragmenten hergestellt. In pSP64-A1 verbleiben im Fragment sowohl die zu pgt1.3 homologen als auch nicht-homologen Bereiche, während in pSP64-A2 ausschließlich der Bereich enthalten ist, für den keine Homologie zur pgt1.3-Nukleotidsequenz besteht.

Die mit diesen Plasmiden synthetisierten RNA-Proben wurden an poly(A⁺)-RNA aus adulten Fliegen hybridisiert, da nur in diesem Stadium (und in späten Puppen) die mit pgt1.5 nachweisbaren T1-, T2- und T3-RNAs gemeinsam vorhanden sind.

Erwartungsgemäß wurden mit der RNA-Probe, die sowohl homologe als auch nicht-homologe cDNA-Bereiche enthält, alle drei Transkripte nachgewiesen (Abb.12B, Bahn A1). Ein völlig identisches Bild wurde jedoch auch mit der von pSP64-A2 synthetisierten RNA-Probe erhalten (Bahn A2). Da zwischen pgt1.5 und pgt1.3 keine Homologie im Bereich von 130bp 5'-aufwärts zur 910bp identischen Sequenz vorhanden ist, muß dieses Ergebnis dahingehend interpretiert werden, daß im pgt1.5 cDNA-Fragment neben diesen internen divergierenden Bereichen innerhalb des 5'-liegenden 250bp EcoRI/PstI-Fragments Homologien zu allen drei RNAs vorhanden sind. Eine solche interne Heterologie zwischen Transkripten kann verschiedene Ursachen haben. Entweder liegt ein Austausch von Exons vor oder eine der RNAs repräsentiert ein Primär-Transkript, welches noch Intron-Sequenzen enthält. Um diese Frage zu klären wurde die genomische Anordnung der cDNA-zugehörigen Transkripte untersucht.

A

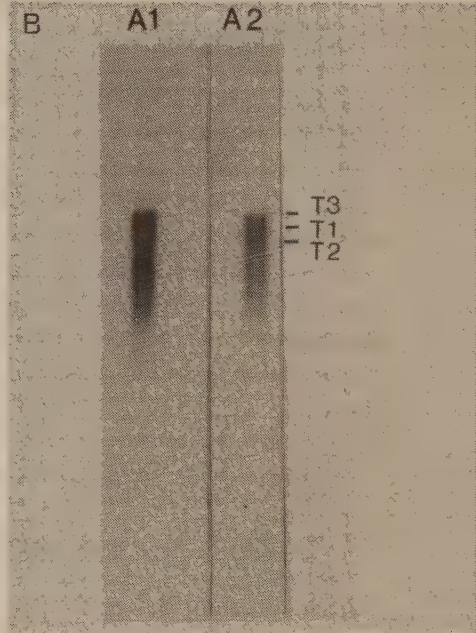
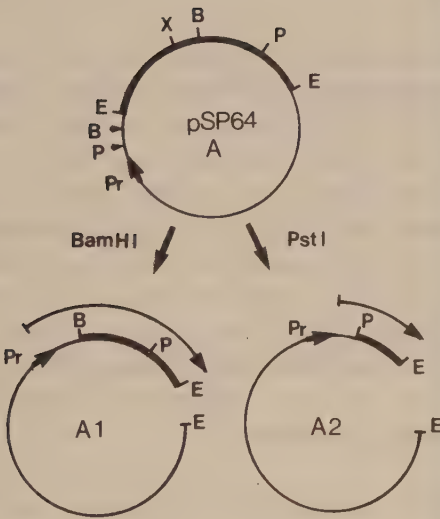


Abbildung 12

A: pSP64-A (Konstruktion siehe Abb. 7A) wurde mit den angegebenen Restriktionsenzymen geschnitten und auf niedrigschmelzenden Agarosegelen fraktionierte. Die Plasmide A1 und A2 wurden durch Religation der geschnittenen DNA erhalten. Beide Plasmide wurden präparativ isoliert und nach Linearisierung mit EcoRI zur *in vitro*-Transkription eingesetzt (siehe 2.5.3.) Die Bezeichnung der Restriktionsstellen erfolgte analog zu Abb.9) (Pr., SP6-Promotor)

B: Je 2µg polyA⁺-RNA (Adult) wurden auf Formaldehyd/Agarosegelen fraktioniert und auf Nylonmembranen transferiert.
Die Hybridisierung erfolgte mit jeweils 7×10^6 cpm/ml der *in vitro*-transkribierten A1-Probe (Bahn A1) und A2-Probe (Bahn A2).
Belichtungszeit: 1.5 Tage.

3.5. Genomische Organisation der Transkripte

3.5.1. Subklonierung und Restriktionsanalyse genomischer Fragmente

Zur Charakterisierung der genomischen DNA wurden die in Abbildung 13A dargestellten λ -Phagen verwendet. Die vergleichbare Abfolge und Lage der Restriktionsstellen (A.Baumann, persönliche Mitteilung) innerhalb der Mc λ - und λ E91B-DNA läßt vermuten, daß in dieser Region zwei aufeinanderfolgende identische DNA-Bereiche existieren. Da die kodierenden Bereiche somit nicht mehr ausschließlich auf den Mc λ -Phagen eingegrenzt waren, wurden die genomischen Fragmente A, D, E und F (Abb.13A) in entsprechende Plasmid-Vektoren subkloniert. Aus den Restriktionskarten der resultierenden Subklone (Abb.13B) ist zu entnehmen, daß zwei tandemartig angeordnete, bezüglich ihres Restriktionsmusters identische DNA-Bereiche (D1, D2) von jeweils 7.4kbp-Länge vorliegen.

3.5.2. Identifizierung transkribierter genomischer Bereiche

Zur Bestimmung der transkribierten genomischen Bereiche wurden die Subklone pUC18-A, pSP64-E sowie pc λ (Abb.13B), die den gesamten duplizierten DNA-Bereich überdecken, mit verschiedenen Endonukleasen verdaut, gelelektrophoretisch getrennt (Abb. 14A) und die resultierenden DNA-Fragmente auf eine Nylonmembran transferiert. Die Hybridisierung der DNA-Blots erfolgte mit isolierten "nick translatierten" pgt1.5 und pgt1.3 cDNA-Fragmenten bzw. aufgrund der für eine "nick translation" zu geringen Länge des pc7-90 cDNA-Fragments in diesem Fall mit dem pc7-90 Plasmid.

Der Vergleich der pgt1.5- und pgt1.3-cDNA Hybridisierung (Abb.14B und 14C) zeigt, daß in beiden Fällen ein 0.7kbp BamHI sowie ein 0.33kbp PstI/BamHI Fragment nachgewiesen werden (Abb.14 B und C, Bahn4). Dies ist auf die 910bp- Identität der beiden Klone zurückzuführen. Weitere Fragmente, die mit beiden cDNA-Klonen hybridisieren, wurden nicht beobachtet. Mit pgt1.3 wurde eine Hybridisierung an einem 1.6kbp PstI-Fragment gefunden, während mit pgt1.5 ein 1.3kbp PstI- sowie ein 0.65kbp SstI/PstI- und ein 1.65kbp PstI/ApaI-Fragment hybridisierten. In Abbildung 16 sind die Posi-

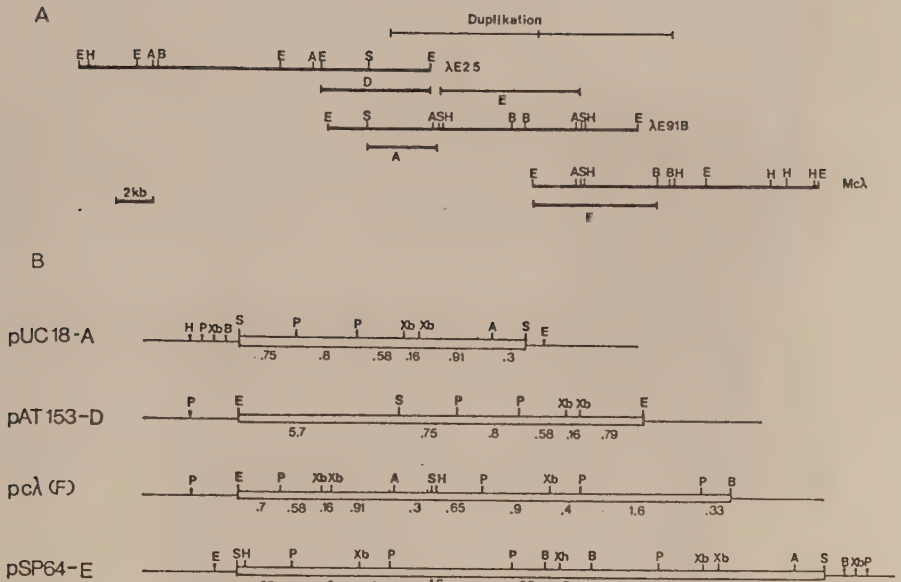


Abbildung 13

A: Darstellung der repräsentativen λ-Phagen der genomischen Tandem-Duplikation.

Die Fragmente (A, D, E, F) wurden durch Restriktion mit den jeweils erforderlichen Endonukleasen isoliert und in die Plasmid-Vektoren pUC18 (Fragment A), pAT153 (Fragment D und F) und pSP64 (Fragment E) umklontiert

B: Restriktionskarte der Subklone

Angegeben sind die Restriktiosschnittstellen sowie die Fragmentlängen in Kilobasenpaaren.

(A, ApaI; B, BamHI; E, EcoRI; H, HindIII; P, PstI; S, SstI; Xb, XbaI; Xh, XhoI)

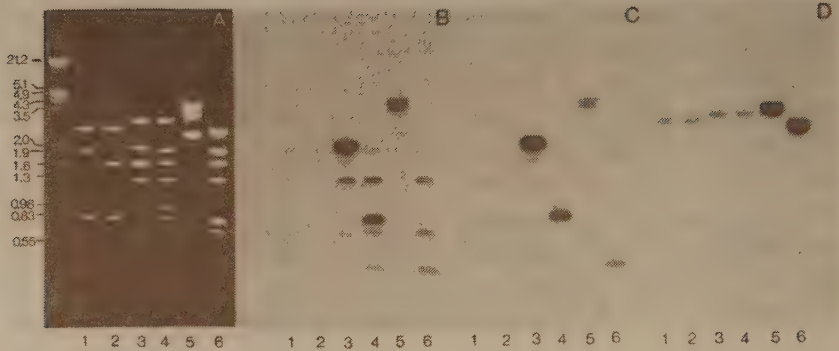


Abbildung 14 Hybridisierung der cDNA-Klone an genomische DNA-Fragmente

Je 0.2µg der Plasmide pUC18-A, pSP64-E und pcλ wurden mit den angegebenen Restriktionsenzymen geschnitten und auf 1%igen Agarosegelen fraktioniert (A). Die einzelnen Bahnen enthalten:

- M λ /EcoRI/HindIII
1 pUC18-A /SstI/PstI
2 pUC18-A /SstI/PstI/ApaI
3 pSP64-E /SstI/PstI/ApaI
4 pSP64-E /SstI/PstI/BamHI
5 pcλ /EcoRI/BamHI/ApaI/SstI
6 pcλ /EcoRI/BamHI/PstI/SstI

Die Fragmente wurden auf Nylonmembranen transferiert und mit jeweils 5×10^6 cpm/ml (spez. Akt. 5×10^6 cpm/µg) "nick translatiertem" pgt1.5 cDNA-Fragment (B), pgt1.3 cDNA-Fragment (C) und pc7-90 Plasmid (D) hybridisiert.

Belichtungszeit: 4 Stunden

tionen der jeweils hybridisierenden Fragmente für den genomischen Bereich zusammenfassend dargestellt.

In der mit pc7-90 durchgeführte Analyse (Abb. 14D) wurde neben den starken Hybridisierungssignalen der Vektor-DNA lediglich ein schwaches Signal eines 2.0kbp PstI-Fragments beobachtet (Abb.14D, Bahn 3). Dieses Fragment enthält intern das 0.7kbp BamHI- sowie das 0.33 kbp PstI/BamHI-Fragment, die zwar beide mit pgt1.5 und pgt1.3-cDNA jedoch nicht mit pc7-90 hybridisieren (siehe Abb.16). Aus diesem Grund konnten die zur pc7-90 cDNA homologen Bereiche auf das folgende 0.9 kbp BamHI/PstI-Fragment und das in pc λ aufgrund der DNA-Duplikation entsprechend vorliegende 0.7kbp EcoRI/PstI-Fragment eingegrenzt werden. Die Hybridisierung in dieser

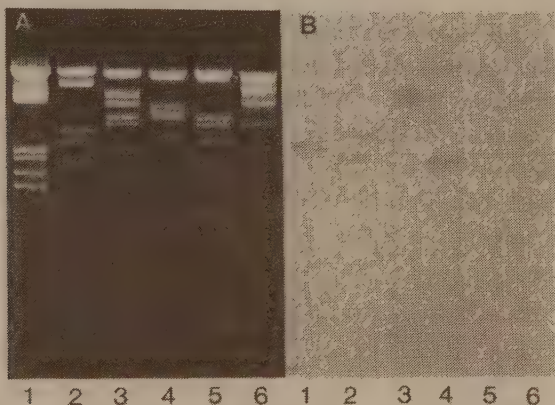


Abbildung 15: Hybridisierung von pc7-90 an λ -Phagen

A: Die DNA der λ -Phagen λ E2.5, λ E91B, Mc λ und λ EO.7 (Abb.13A und Abb.1) wurde mit den angegebenen Restriktionsenzymen geschnitten auf 0.8%igen Agarosegelen fraktioniert und auf eine Nylonmembran transferiert.

Die Gelbahnen enthalten:

- 1 λ E2.5 /EcoRI/SstI
- 2 λ E91B /BamHI/SstI
- 3 λ E91B /EcoRI/HindIII
- 4 Mc λ /EcoRI/HindIII
- 5 λ EO.7 /EcoRI/HindIII
- 6 λ /HindIII

B: Hybridisierung mit 5×10^6 cpm/ml "nick translatiertem" pc7-90 Plasmid (spez.Akt. 3×10^8 cpm/ μ g)
Belichtungszeit: 8 Stunden

Gelregion (Abb.14D, Bahn 6) konnte jedoch nicht eindeutig zugeordnet werden, da in diesem Bereich neben dem 0.8kbp Eco/PstI-Fragment auch das 0.75kbp PstI/EcoRI-Fragment des pAT153-Vektors vorhanden ist. Um auszuschließen, daß die Hybridisierung auf dieses Vektorfragment zurückzuführen ist, wurde eine weitere Hybridisierung an fragmentierte Phagen-DNA durchgeführt (Abb.15). Die mit pc7-90 hybridisierenden genomischen Bereiche waren somit eingrenzbar auf ein 3.5kbp SstI-Fragment innerhalb der 1. Duplikation (D1) und auf ein 2.65kbp EcoRI/HindIII-Fragment in der 2. Duplikation (D2). Zusammen mit den in Abb. 14D gezeigten Ergebnissen wurden die pc7-90 homologen genomischen Bereiche auf ein in D1 vorhandenes 0.8kbp PstI-Fragment und einem entsprechenden 0.9kbp BamHI/PstI-Fragment in D2 eingegrenzt (siehe Abb.16).

Aus der zusammenfassenden Darstellung der hybridisierenden genomischen Fragmente (Abb.16) ist zu entnehmen, daß transkribierte Bereiche für pgt1.5 und pgt1.3 cDNA in vergleichbaren Regionen beider Teile der Tandem-Duplikation nachweisbar sind. Neben Homologien der beiden cDNAs im 0.33kbp PstI/BamHI- und 0.7kbp BamHI-Fragment enthalten die weiter 5'-liegenden PstI-Fragmente die bereits aus der Sequenzierung ermittelten divergierenden Bereiche der beiden cDNA-Klone (siehe 3.3.). Die Homologien liegen für pgt1.3 im 1.6kbp PstI-Fragment, für pgt1.5 erst im weiter 5'-aufwärts liegenden 1.3kbp PstI-Fragment. 5'-aufwärts zum 1.3kbp-PstI-Fragment sind weitere transkribierte Bereiche in einem 0.65kbp SstI/PstI- und einem 1.65kbp PstI/ApaI-Fragment ausschließlich mit pgt1.5 nachweisbar. Da mit dem 5'-Ende der pgt1.5 cDNA (250bp EcoRI/PstI-Fragment), das Homologien im genomischen 1.65kbp PstI/ApaI-Fragment aufweist, drei Transkripte (von denen mindestens eines der pgt1.3 cDNA zugeordnet werden muß) nachgewiesen wurden (siehe 3.4.2.), mußten pgt1.3 zugehörige Sequenzen - die jedoch nicht mehr in der pgt1.3 cDNA Sequenz enthalten sind - ebenfalls im 1.65kbp PstI/ApaI-Fragment vorhanden sein.

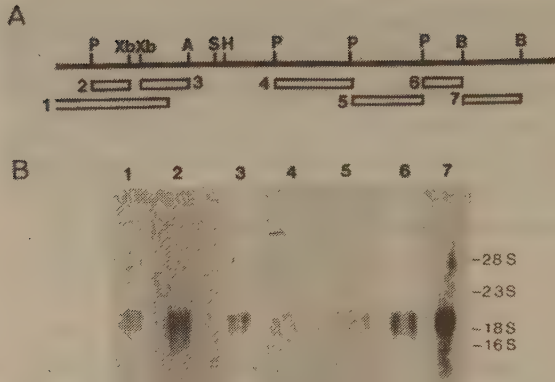


Abbildung 17 Hybridisierung genomischer Fragmente an polyA⁺-RNA

A: Positionen der zur Hybridisierung verwendeten Fragmente (1-7) innerhalb des genomischen Bereichs. Die Fragmente wurden aus den entsprechenden Subklonen isoliert (3.1kbp SstI/EcoRI (1) und 0.58kbp PstI/XbaI (2) aus pAT153-D; 0.91kbp XbaI/ApaI (3) aus pUC18-A; 1.3kbp PstI (4), 1.6kbp PstI (5), 0.33kbp PstI/BamHI (6) und 0.7kbp BamHI (7) aus pSP64-E), in pSP64 umklontiert (Fragment 2,3,6 und 7) und die Plasmide "nick translatiert". Fragmente 1,4 und 5 wurden direkt zur "nick translation" eingesetzt.

B: polyA⁺-RNA wurde auf Formaldehyd/Agarosegelen fraktioniert und auf Nylonmembranen transferiert. Die Bahnen enthalten 2µg Oocyten-RNA (1-5), 2µg RNA aus 0-4 Stunden Embryonen (6) und 5µg RNA aus adulten Fliegen (7). Hybridisiert wurde mit jeweils 5x10⁶ cpm/µl (spez. Akt. 4-6x10⁸ cpm/µg der "nick translatierten" Proben 1-7. Belichtungszeit: 4 Tage

Homologien zur pgt1.3 cDNA (Abb.14 B), so daß ebenfalls eine Zuordnung der pgt1.3 cDNA zur T1-RNA in Oocyten möglich war. Die Herkunft der in den Bahnen 4-6 (Abb. 17B) beobachteten Signale im Größenbereich von 0.6-0.7kb ist unbekannt. Eine Relation zu den im EcoRI/BamHI-Fragment nachweisbaren Transkripten (Abb.2B) besteht nicht.

Zusammengefaßt zeigen diese Analysen, daß offensichtlich zwei Transkripte mit weitgehend identischen 5'- und 3'-Regionen vorliegen, in denen jedoch interne Bereiche enthalten sind, die aus der alternativen Verwendung transkribierter Bereiche im 1.3kbp- und 1.6kbp PstI-Fragment resultieren.

3.5.3. Sequenzierung der genomischen DNA

Um durch einen Vergleich mit den in 3.3 ermittelten cDNA-Sequenzen eine exakte Bestimmung der kodierenden genomischen Bereiche durchzuführen, wurden die Fragmente, die transkribierte Regionen enthielten, in M13mp18/19 kloniert und sequenziert. Zur Eingrenzung des duplizierten DNA-Bereichs wurden zusätzlich die Fragmente sequenziert, in denen der Anfang oder das Ende der jeweiligen Duplikation vermutet wurde.

Abbildung 18A zeigt schematisch die verfolgte Sequenzierungs-Strategie.

Soweit dies für einen Vergleich mit den cDNA-Sequenzen nicht notwendig war, wurde auf eine vollständige Sequenzierung der Fragmente verzichtet und nur die Sequenz von 300-400 Nukleotiden der endständigen Fragment-Bereiche ermittelt.

Für Fragmente, die unterschiedliche Restriktions-Enden aufwiesen, wurde die relative Orientierung durch gerichtete Klonierung in M13mp18 oder M13mp19 vorbestimmt.

Die Orientierung von Fragmenten mit identischen Restriktionsenden wurde in den meisten Fällen über eine intern liegende Restriktionsstelle ermittelt, so daß jeweils erkennbar war, welcher der beiden DNA-Stränge bezüglich der genomischen Orientierung sequenziert wurde.

In einigen Fällen konnte eine direkte Zuordnung nicht durchgeführt werden. So wurde die genomische Orientierung des 0.16 kbp XbaI-

Fragments (Sequenzierung Nr.16/17) erst durch eine zusätzliche Sequenzierung möglich, in der anstelle des üblicherweise verwendeten Sequenzierungs-Primers ein synthetisiertes Oligonukleotid (P3, siehe 2.11.3.) verwendet wurde. Die Nukleotid-Sequenz dieses Oligonukleotids wurde aus der vorher ermittelten Sequenz des 0.58kbp PstI/XbaI Fragments (Sequenzierung Nr.1) abgeleitet. Für die Sequenzierung (P3, Abb.18A) wurde das 1.95kbp PstI/SstI-Fragment aus pUC18-A (Abb. 13B), welches intern das 0.16kbp XbaI-Fragment enthält, in den M13mp18-Polylinker kloniert, so daß die Sequenzierung mit dem Oligonukleotid über beide XbaI-Stellen erfolgen konnte.

Die Orientierung des 0.8kbp PstI-Fragments im Bereich der ersten Duplikation wurde indirekt über den Vergleich mit den Sequenzen des 0.9kbp BamHI/PstI-Fragments am Anfang der zweiten Duplikation bestimmt, da die aus Nr.6 und Nr.19 ermittelten Nukleotidsequenzen völlig identisch waren.

Die Orientierung des 1.6kbp PstI-Fragments wurde über einen Vergleich mit der pgt1.3 cDNA-Sequenz möglich, da die Nukleotide 128-170 (Abb. 10B) identisch in der aus Nr.23 ermittelten Nukleotidsequenz nachweisbar sind.

Zur Klonierung der meisten Fragmente wurden die im M13mp18/19-Polylinker vorhandenen Restriktionsschnittstellen verwendet. Lediglich die Klonierung des 0.91kbp XbaI/ApaI- und 0.3kbp ApaI/SstI-Fragments konnte nicht direkt durchgeführt werden, da keine ApaI-Stelle im Polylinker vorhanden ist. Durch Restriktion von pUC18-A (Abb.13B) mit ApaI und anschließendem Zurückschneiden der 3'-überhängenden ApaI-Enden mit T4-DNA-Polymerase (siehe 2.7.5.) wurden stumpfe Enden generiert. Durch Nachschneiden mit XbaI und SstI wurde das 0.91kbp Fragment und das 0.3kbp Fragment erhalten. Die Klonierung des 0.91kbp Fragments erfolgte in die SmaI und XbaI-Stelle des M13mp19-Vektors, so daß eine Sequenzierung von der ApaI- in Richtung zur XbaI-Stelle durchgeführt werden konnte (Sequenzierung Nr.24). Die Sequenz von der ApaI-Stelle in Richtung auf die SstI-Stelle (Sequenzierung Nr.25) wurde über das in die SmaI- und SstI-Stelle des M13mp18 klonierte 0.3kbp Fragment ermittelt.

Da mit den durchgeführten Sequenzierungen Nr.9 und Nr.24 nicht die gesamte Sequenz des 0.91kbp XbaI/ApaI-Fragments bestimmt werden

konnte, wurde zusätzlich das 0.79kbp XbaI/EcoRI-Fragment aus pAT153-D (siehe Abb. 13B) in M13mp19 kloniert. Mit dieser Sequenzierung (Nr.26) wurden etwa 100 Nukleotide zusätzlich zu der aus Nr.24 erhaltenen Sequenz ermittelt. Eine Überlappung mit den aus Nr.9 ermittelten Sequenzen wurde jedoch nicht gefunden. Um die Sequenz der verbleibenden Bereiche zu bestimmen wurde ein Oligonukleotid (P2) verwendet. Die P2-Nukleotidsequenz wurde komplementär zu den Nukleotiden 22 bis 44 der pgt1.5 cDNA-Sequenz (siehe Abb.10A) synthetisiert, da die entsprechenden Homologien auch aus der Sequenzierung Nr.26 abgesichert werden konnten.

Abbildung 18B zeigt zusammenfassend die ermittelten Nukleotidsequenzen. Auf die Darstellung der aus den Fragmenten der zweiten Duplikation ermittelten Nukleotid-Sequenzen wurde verzichtet, da diese völlig identisch mit den aus vergleichbaren Fragmenten der 1. Duplikation (D1) ermittelten Nukleotidsequenzen waren. Zur besseren Übersicht sind nur die Anfangs- und End-Bereiche der zweiten Duplikation (D2) gezeigt.

Aus dem Vergleich mit den cDNA-Sequenzen (Abb.10A,B) konnten die Exon-Bereiche innerhalb der genomischen Sequenz für pgt1.5 vollständig, für pgt1.3 zunächst nur für den homologen 910bp-Bereich lokalisiert werden. Die Nukleotide 1038 bis 1119 der pgt1.3-Sequenz (Abb.10B) in den unter anderem ein mögliches Polyadenylierungs-Signal vorliegt, sind mit den Nukleotiden 5923 bis 5999 der ersten Duplikation (D1) identisch. Im 3'-folgenden genomischen Bereich sind G/T-Sequenzen zu finden (Nukleotide 6018-6040), die in vielen Fällen das 3'-Ende einer RNA charakterisieren (Birnstiel et al. 1985).

Eine Zuordnung der Nukleotide 1-128 der pgt1.3 Sequenz (Abb.10B), deren homologen Bereiche im 1.6kbp PstI-Fragment vermutet wurden (siehe 3.5.2.), war mit den aus Nr.22 und Nr.23 (Abb.18A) erhaltenen Sequenzen nicht möglich. Zur Bestimmung interner Sequenzen wurde ein analog zu den Nukleotiden 21-39 des kodierenden pgt1.3 cDNA-Strangs (Abb.10B) synthetisiertes Oligonukleotid (P1) verwendet. Aus dieser Sequenzierung (P1, Abb.18A) wurden etwa 250 Basen im 1.6kbp PstI-Fragment ermittelt, wobei noch eine Überlappung von 2 Nukleotiden mit der pgt1.3 Sequenz (Nukleotide 11-12, Abb.10B) vorhanden war. In den

zusätzlich zur pgt1.3 Nukleotidsequenz erhaltenen Nukleotiden ist eine Konsensus-Sequenz vorhanden, die eine mögliche Intron/Exon-Grenze darstellt (Nukleotide 4478/79, Abb.18B). Bei Verwendung dieser Spleiß-Stelle wird ein durchgehender, offener Leserahmen gefunden, der mit dem für pgt1.3 erhaltenen Leserahmen identisch ist.

In den mit dem pc7-90-Klon hybridisierenden genomischen Bereichen (siehe Abb.16) wurden keine mit der pc7-90 cDNA (Abb.10C) vergleichbaren Nukleotidsequenzen identifiziert. Dieses Ergebnis ließ sich damit erklären, daß die Homologien in den 200-300 Nukleotiden der internen Fragment-Bereiche liegen, für die keine Nukleotidsequenzen ermittelt wurden. Aufgrund der geringen Intensität der Signale in den mit pc7-90 durchgeführten Hybridisierungen an die genomischen Fragmente (Abb.15) bestand jedoch auch die Möglichkeit, daß für die pc7-90 DNA nur schwach homologe Nukleotidsequenzen im untersuchten genomischen Bereich vorhanden sind und folglich diese DNA nicht aus diesem Bereich stammt. Dies wurde durch eine *in situ*-Hybridisierung der pc7-90 cDNA an polytäre Speicheldrüsen-Chromosomen bestätigt. Da ausschließlich in der 28C-Region eine Hybridisierung beobachtet wurde (A. Baumann, persönliche Mitteilung), bestand somit kein Bezug der pc7-90 cDNA zur genomischen DNA aus dem 16E/F Bereich, so daß weitere Analysen mit diesem Klon nicht durchgeführt wurden.

Abbildung 18

A: Sequenzierungs-Strategie

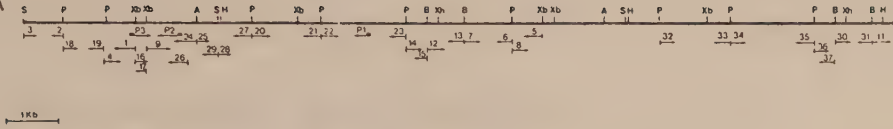
Die einzelnen Sequenzierungen sind durch Zahlen bezeichnet. Die Pfeile geben die Länge und Richtung der durchgeführten Sequenzierungen für die einzelnen genomischen Fragmente an.

B: Nukleotidsequenz

Dargestellt ist die Nukleotidsequenz des codierenden DNA-Strangs (=RNA). Auf die vollständige Darstellung der Sequenzen aus der zweiten Duplikation wurde verzichtet. Beginn und Ende der jeweiligen Duplikation (D1, D2) sind bezeichnet. Die mit der Restriktionskarte (A) korrelierbaren Restriktionsstellen sind unter der Nukleotidsequenz angegeben. Für die durch eine unterbrochene Linie bezeichneten Bereiche wurde die Nukleotidsequenz nicht ermittelt. Die Zahlen geben die Länge der fehlenden Sequenzen in Kilobasenpaaren an. Die Linien über den Nukleotidsequenzen bezeichnen die Exon-Bereiche.

(Y, Exon/Intron Grenzen; □, TATA-Box; —, CAAT-Box; ==, Polyadenylierungs-Signal; *, Transkriptions-Start; ▸, Translations-Start; 5'—^P—3', Position der verwendeten Oligonukleotide)

A



B

10	20	30	40	50	60
<u>GAGCTCTCGA</u>	ACCAATCAAG	GTGGATTITT	TGTTCAAAAA	TATTICTTTA	AGCCGACTTT
SstI					
70	80	90	100	110	120
ATGCTTTAC	TTTAAATTAA	TTTCCGCTCT	ATGCATTAA	CAATGCATT	GCATTGGGA
130	140	150	160	170	180
CCACTAGTTC	ACGACAGCTT	GAGTGTAAAT	TTTTTAATGG	ACTTTTTTTT	TTAATTCAA
190	200	210	220	230	240
-----	--350BP--	-----	-----	TTGAAA	CCGCATACCT
250	260	270	280	290	300
CATCTGGAT	TCITTCGCTC	TCGATATCCA	CTTCCTTGGC	TAACGATCCG	CAGAGGCTCT
310	320	330	340	350	360
TCGATTGAGA	AATGCGGACA	ATCCGTGCG	TGCTCACC	ATTGGGTTT	GGAGACCAT
370	380	390	400	410	420
CCTCGATCGA	GTTCGCCAAG	GTAACATCCA	CGCATGAGCT	GAAGAACCAG	GTCAACGGCA
430	440	450	460	470	480
TGTCGGAAC	CATCAAGGAC	<u>CTGCAG</u> ACCC	GCATTGGCCC	ACAAGAACA	CTCTGCTCTG
		PstI	DI		
490	500	510	520	530	540
CTGCAAGCCG	GTGAGATCAA	GGACCAAAGT	GACAGGCTCA	ACGTTTGA	TCAAAAACAT
550	560	570	580	590	600
TGAAAGTCTT	TCGAAGTGAG	TGCTGGAATG	CCCAGGCCGA	GATTCAAAG	CAAGGACATT
610	620	630	640	650	660
ACAAATACAA	TTTGAGCCCG	GC-----	-----400BP	-----	-----CGGCCA
670	680	690	700	710	720
CATGAGCGCC	AAAGTTCACC	ACCAACGACA	AGGACAACGA	TGCCTATCGG	TTCAAACGT
730	740	750	760	770	780
GCCCGCGACG	AATATGGTGG	CTGGTGGTAC	TACGATTGCG	CCAAGAGGTA	AGTACGCCCA
790	800	810	820	830	840
TTATATACAT	ATGGTATATA	TACATATGTA	CTTGCAATGA	ATATTAAATG	CGCGAGTAA
850	860	870	880	890	900
<u>TGCAGCATGC</u>	TCAATGGCAA	GTCTACAA	GAGGGCCGCT	CGCGGAATGG	AAAAACCAAT
PstI					
910	920	930	940	950	960
GGCATCTCTG	GGGGCTCCGT	GGCACAACA	CGATTGGACC	TACTCGCTAA	CCCTCGTGA
970	980	990	1000	1010	1020
GATGATGATA	AGGCCCGCAA	TAGATTAGCT	ATTACAGTAA	GAATAAAAAA	ATGCCACAAA
1030	1040	1050	1060	1070	1080
TAAACGAARA	GGTCTCATTT	GTAATCATTA	CATTCAAATT	CAATTAAATT	AAATAACGGG
1090	1100	1110	1120	1130	1140
CACCTACTAA	ACTTTTCTCG	CCGTGTATGC	CCCTGGTATT	TTTGTATGCC	ATATTCTGGC
1150	1160	1170	1180	1190	1200
ATATGCGCGT	<u>ATATG</u> CGCG	CTGG <u>TAATTT</u>	TTGCCTAACC	CGCTACGCAC	ACACTGCGAA
1210	1220	1230	1240	1250	1260
TATTCGGCCA	AAAACATAGT	TATATTTTGT	TCTGTGGGCT	TTTAGACAAA	TTGTAAACTG

Abbildung 18

1270	1280	1290	1300	1310	1320
ATAGCTCCCG	ACCCACGCGG	TTTAACGGTG	TCCAATTGA	CAGTGCAACC	GGTGGACACG
1330	1340	1350	1360	1370	1380
GTGGAGCACA	AGCAGCGGCA	CCCAGAAGGA	AACCAUGCAT	CCAGTCACAA	CAATCGCTCG
1390	1400	1410	1420	1430	1440
TTGAGAGCGG	AGCGATAAGA	GTTCAGAGT	TTCAGAGTT	TCCAGCATA	CCCAGCAGTG
P3 1450 1460 1470 XbaI 1480 1490 1500					
GTGAGTAGCT	AGTAGACAGT	CGTCGCACTG	CTCAGCAGTG	CTCAGTGCCC	AGTGAGCAGT
1510	1520	1530	1540	1550	1560
TCCGUCGAGC	AGACCCCGTG	AGATACCGCG	GCGAACAACT	AACAACTAAG	ATACTCTGCC
1570	1580	1590	1600	1610	1620
CCTTTTCTAG	ACGCAGCTGA	GCCCCAGATC	CCAGATCCCA	GATACCAACA	GCAGACCGAC
XbaI 1630 1640 1650 1660 1670 1680					
CCAAGCAGAA	CGATCATGTC	CAGCGACGCC	AATACGCCCG	TGCTGCCCAA	CTGCATCCGC
1690	1700	1710	1720	1730	1740
TTGCTGCTGG	CGGAGGATGA	GCTACTGGAG	GTGACGGCCA	AGGCCAAGGA	TTATGCCATT
1750	1760	1770	1780	1790	1800
ATGACCGGCG	CGGCCATGCG	ATCGAAGACG	GCCCTCAGTC	CGGACTCGTT	GAATGTGGGT
1810	1820	1830	1840	1850	1860
GATACAATGG	GCATCGCTA	GTGAGGGCTC	GTAITCATGC	TTAAGGTGTC	TAGTTTCCGC
1870	1880	1890	1900	1910	1920
TCAAGAAGCT	CATTTCATAG	GAACAACTAT	CATTACACAT	CCCTTATCGA	GTTCACTTCC
1930	1940	1950	1960	1970	1980
TTTTTAAAGT	TATGTGTAAT	GCCAAATGTG	ATTGGATGCT	TGAGTTTGTT	TITCATTTTA
1990	2000	2010	2020	2030	2040
TTGAGGTTAG	AGAGAAGATT	AGCAATTGTT	GCGGTAAAG	CTACACATTG	GCATTACAAT
2050	2060	2070	2080	2090	2100
TCGAGCTTCA	AGCTAGCGTG	CTGCTGCTTG	AGCAAAAGT	TTGCCAGGAT	ACTAAACATT
2110	2120	2130	2140	2150	2160
TTCATTTTCC	AGTTGCGCCC	CTTCGTGCTG	GTGCTTCTCT	CGTTTCCGCG	CAAGGAGTTC
2170	2180	2190	2200	2210	2220
GAAAAGGCGG	TGGCCCTACA	GCGGATCATC	AACCGGCTGA	TGCACAAATG	GGCCACAGAC
2230	2240	2250	2260	2270	2280
GAGGAGTTCA	TCAGACGAC	GCTGCGGAG	ACGATCAAAG	TGGACGAGTT	CACGGCCAAT
P2 2290 2300 2310 2320 2330 2340					
CTGTTCAACA	TCTATCGCAA	GTGCTGGCGC	ACGGATTAC	CCAGGTGAGA	TTCGCTACG
2350	2360	2370	2380	2390	2400
TGGCGTCCAT	CCATCTCGGA	TCCGCCCTCT	GCACACATC	ATCGIATCAC	CGGCCAACGG
2410	2420	2430	2440	2450	2460
TATCCAGCCT	CATTCCCATC	GGGAGGGAGC	ACATCTACAG	GCAGCCAGTG	GGTACTCGC
2470	2480	2490	2500	2510	2520
TAGGATTIAT	GGGCTTCA	CCCGGGTCG	CAATCTATC	GCCATTCAT	AAATGCCCGG
Apal					

Abbildung 18 (Fortsetzung)

2530	2540	2550	2560	2570	2580
GCCATAGCCA	TAGCCGAGT	CAGAGCCAG	AAGTCGCTG	TAGTCGCTAA	TCICCGCTGA
2590	2600	2610	2620	2630	2640
TTTATGCGAG	CATCCTGGCC	TCACAGCTCC	TTAATCGTTG	GCTTGTAAT	CGACGTAGGA
2650	2660	2670	2680	2690	2700
CAGCCCATCC	TGACCCCAT	AACGCTAGAA	CTTTGCCATT	GCTCTCCTA	CTTTGATTTA
2710	2720	2730	2740	2750	2760
CATGCCTTTC	CCCTAACGTA	ACCAGCACAG	AGGCGAATCC	ATTAGCTCT	TCCACGTCCA
2770	2780	2790	2800	2810	2820
CAAGAAGCTT	TAATCTTTGT	AGATCCTATC	AGAAAGG1GA	CAGTTTACAA	ATTGTAATAG
2830	2840	2850	2860	2870	2880
TTATTGGCCC	GGTAACTGAT	AGGGTTTATT	AAATATAACA	ATGCCAGCCG	TATTTTACT
2890	2900	2910	2920	2930	2940
TTATTACTAT	TCAAACCTTG	TCTCGAATCT	TATCGAAGTC	TCAAT1GAAG	CATTTAATG
2950	2960	2970	2980	2990	3000
CTAGAATCAA	TTAAACTATT	GTTCATTTTA	AATCGTTTGA	TTTITTGCCA	ATGATTITCA
3010	3020	3030	3040	3050	3060
ATGTTTITAC	TTCGAACCTA	ATCATTTTCA	TCACCCAATA	TCAGTTTAG	TTCGGAATT
3070	3080	3090	3100	3110	3120
TGCTCTCTGT	GCAAATTAGT	CCAGACTGTG	CTTTCTCGC	ACA-----	-----
3130	3140	3150	3160	3170	3180
TATAGCGTTT	CGCCTTGACT	GACTCAGCTC	TTAATATGAC	TCATGTTCCA	AACTGGAACA
3190	3200	3210	3220	3230	3240
ACACTCAACC	CTATCTCGGG	CTATCTTTT	GATTTATAAG	GATTITGCGG	ATTTCGGAAC
3250	3260	3270	3280	3290	3300
CCACCCATTG	AAAATGATT	TGATTTCAAA	AGAAAACATC	GCTGGGGATG	CTGCGCAGCG
3310	3320	3330	3340	3350	3360
ATCTGTAGCT	GGAGTCCGGC	TGTCCCGAGC	TGTGCCACGG	CGCTGCGAA	CGCGCGCCGG
3370	3380	3390	3400	3410	3420
TGAGGATCGT	GGTCAGGATG	CGGCGCTG	TGTGGGCGAA	ATAGCTGGAG	CTAACGGAGT
3430	3440	3450	3460	3470	3480
TGCAAGAGTC	GGAAGTCCG	CTGGCAGCGG	CAGCAAGGAG	GAGGAGGAGC	ACAGGGAGGT
3490	3500	3510	3520	3530	3540
CCAGCTAAGC	CGGCTACCA	AAGAGCCGGA	ACGAGGGCGA	CGGCGCCAG	TCCGCTTACT
3550	3560	3570	3580	3590	3600
GCTGCTGGAA	GCAAGTCGAG	ATCAATACGA	TAGCATCGGG	CTTTGGCGTT	TGGACCAGCA
3610	3620	3630	3640	3650	3660
AGTAACAAT	CAAGTGCTG	TTCACGCGCA	CAGTGCATCC	AGTGCAATC	GCACCAGCC
3670	3680	3690	3700	3710	3720
ATCATCAGCA	CAACCTTAA	AAAAAACCA	GATTTCCTTC	CATGACAG-	-----
3730	3740	3750	3760	3770	3780
-900BP----	ATTAAAGTGT	TGGATTACA	TTCACATCAA	TGTGATGT	AAACAGCAA

Abbildung 18 (Fortsetzung)

3790 3800 3810 3920 3930 3940
 AGGCCCTAAT CAAAAATTTC ACCACTTGTA CGCTTGGGCT ATTAAACCC TAGAGTTTC
 3850 3860 3870 3880 3890 3900
 TGGAGGTGGA ATTAACAAT TTAATTGTTT GAAAGAACAA ATGTAGTTTT TACTGCAIA
 3910 3920 3930 3940 3950 3960
 GATATTAAAC TCACTCAACA TTTTGGTCAG TGACGTCGTT TTAGACGAAT CACACGTGTA
 3970 3980 3990 4000 4010 4020
 GTTAGGAAGC CCCAGCATGG AGAGCCGACA GCTG^ΨACTGCC AGATAGGGTT ACAGATAGGG
 4030 4040 4050 4060 4070 4080
 ATACCCTGAT ATAGATACGC CTGGTAATTG TTTATTTAAA GTCGAGGCGT GTGCATAAC
 4090 4100 4110 4120 4130 4140
 AGACCAATA AGTGCATTTT GTGGGTGCAA AATGTTTGTC TTCAATTACA AATTCAAGAC
 4150 4160 4170 4180 4190 4200
 TCGAATTAT GAAATGCCAG CAGAACTCAA AACATTTTTC ATGCACGTTT TCGAGTTTTT
 4210 4220 4230 4240 4250 4260
 AGCTGTTTGT CTATTGTGTT AATTGCCGCG ATATGGTGGA CGTAAACATT AATTATAAC
 4270 4280 4290 4300 4310 4320
 AGATTATATC AGAGCTAGTT TAT----- TCTCGCCTCT CTCTCTCTCT CCGTCTCTTT
 4330 4340 4350 4360 4370 4380
 TTGACATATA TATAATTAAA ATTCCGACCT GCCTCATCTT ACATATATAT ACAATATATAT
 4390 4400 4410 4420 4430 4440
 ATATATATAT ATATGCAGCT ATATATCTAT GGACGAGGAT CGTAAACCAT ACCIAGACAT
 4450 4460 4470 4480 4490 4500
 ATTCAATCGC TTTACCGGCT AAGCAGCTAA TCTTTAAGGG ACGCACTTAA TGTATATATA
 4510 4520 4530 4540 4550 4560
 TCTGTATCT CCGATCATAT TGCAGGCATA TAGCATCGCG GCGCGCGTGC ATAAIGCGAC
 4570 4580 4590 4600 4610 4620
 ACGTGTCCGA GGGCTGTGCG ATAAAGCAGA TCGAGATCAA CACGTTGGCC TCAATTTCGC
 4630 4640 4650 4660 4670 4680
 TGCCATAGCC ACCAATTGGT GCCGCAGCAG AA-----
 4690 4700 4710 4720 4730 4740
 TTGTGTGTG CTGCTGTTGT TGGTCGCTGA AAGAACTGCG GAATATGCT AAATGTCTGT
 4750 4760 4770 4780 4790 4800
 CTCTTTCTGT TCGGGCACTA CCCGTCTCTT TCGCCCGCGC AGATTCTGAC TCAAGCAGCG
 4810 4820 4830 4840 4850 4860
 TGGGACATGC GGATAAGCTG CACAATGTGA GTATATTAAA CTAAGATATA TAATCTATAT
 4870 4880 4890 4900 4910 4920
 ATATATAAAC ATATATTCAT GAGTGATATA ATAATTATAT GATCTGTGTT TCCTGTACAT
 4930 4940 4950 4960 4970 4980
 ATAAACGCAG TGAGTAAGCG AAGACACCTT AAATGATAAT GTTCGTATAT CCGCTGCAGA
 4990 5000 5010 5020 5030 5040
 TGCCGGATAA CAATGCACGT GCCGGACTCT CGCATGGCAT GGTGAAGGCG TGGGACATCT
 5050 5060 5070 5080 5090 5100
 ATGCAAGGCG CGAGGCCGTC ATTCTGTTCA TCATCGAGGA TGTGTGCTAC AACATTTCGG
 5110 5120 5130 5140 5150 5160
 ACACGGCGTT CCACGAGTTC TACATTCCGG AGACATATCC GCACATCAAG GTGCTCGGCC
 5170 5180 5190 5200 5210 5220
 GCACCTCTAC CGAGGTCCAT CGGGAGGCCA AACTGGGCCA GTCCAAAGGAG TTGCTCGTGT
 5230 5240 5250 5260 5270 5280
 AAGGTACAT TAATACCTCT ATTAATCATC ATCATTGAAC TGTGTGCTCA ACTCACACGC
 5290 5300 5310 5320 5330 5340
 TTGCCGCACC ACA^ΨTGGATC CCAAGAGGTG GCGCTCATCT ACTTCCGAGC TGGCTACGAG
 BamHI

Abbildung 18 (Fortsetzung)

5350	5360	5370	5380	5390	5400
CCCGGACACT	ATCACTCGCA	GCCGGATTGG	GATGCCCGCT	ATCTGATGGA	GACCTCGCTG
5410	5420	5430	5440	5450	5460
GCCATCAAGT	GCCCGTCGAT	TCACTACCAT	TTGGCGGGCA	CCAAGAAAGT	GCAGCAGGCA
5470	5480	5490	5500	5510	5520
TTGGCGGACG	CGGCGGTGCT	CGAGCGTTTA	TCAACGATCC	GGAGGAGATC	AAGCGCGTGG
	XhoI				
5530	5540	5550	5560	5570	5580
GCAAGATCTT	CACGGGTCTC	TACTCGCTGG	ACGACAACGA	GCCGGGCAAT	GCCAGCTATG
5590	5600	5610	5620	5630	5640
AGATGGCGTG	CGCACTCCGG	AGAGATTGCT	GCTGAAGCCG	CAGCGCGAGG	AAGCGGCAAT
5650	5660	5670	5680	5690	5700
AATGTCACG	CGGTGGATAT	ACCAGATGCA	CTAAGGCGCA	TGTCACCGGT	GGAGCCGTCC
5710	5720	5730	5740	5750	5760
GCCTGGAATC	TGATGGATCT	GATTTCATCG	CCGCTGACCA	AGGGCTATAT	GTCGCGCCCC
5770	5780	5790	5800	5810	5820
GCTGGCGATA	TGCCGCCCCA	GATCGTGGAC	ATGTCCTCCG	AGCTGGGCAT	CTTCGGTGTG
5830	5840	5850	5860	5870	5880
GTGATCGGAG	ATGCGGAGCA	CATTGTGCAC	AACTACCAGG	CGGGACACAT	CGTCCGCACA
5890	5900	5910	5920	5930	5940
AAGCTCTCAA	CCGCCAACGA	AGGAGGCGTG	GCAGCCGGTC	TGGCGGCCCT	GGACAGTCCA
5950	5960	5970	5980	5990	6000
TATCTGATCG	ATAGCGATGA	CGAGGATGAG	CAGAAGTAGG	ATCCTTTAAC	GAGTAAAGG
			BamHI		
6010	6020	6030	6040	6050	6060
CTTCGACGCG	CGGCATCCCA	CCTGTGGCCT	CAGTCTTGTA	TAAATGATTA	TTTTGTAAAG
6070	6080	6090	6100	6110	6120
CGTATTGTAA	ATTTTTTGCA	CTATTTTTC	CCGCTCCCAA	TGTCAATAAA	TAAATGTGTA
		D1		D2	
6130	6140	6150	6160	6170	6180
AACTAGAAAT	TCTGTCAATA	TGCAAACTAT	GCAAAATATG	CCAGGCTCAA	CGTTTGTAAAT
6190	6200	6210	6220	6230	6240
CAAAAACATT	GAAAGTCCTT	CGAAGTGAGT	GTCGTAATGC	CCAGGCGGAG	ATTCAAAAGC
AAGGAC					
10	20	30	40	50	60
GGATCCTTTA	ACGAGATAAA	GGCTTCGAAC	GCCGGCATTC	CACCTGTTCG	CTCAGTCTTG
BamHI					
70	80	90	100	110	120
TATAAGATGAT	TATTTTGTGA	AAGCGTATTG	TAAATTTTTT	GCACATTTTT	TCGCCCGTCC
				D2	
130	140	150	160	170	180
CAATGTCAAT	AAATAAAATG	TTAAACTAGA	AATTCGTGCA	ATATGCAAA	TGGATTITGG
190	200	210	220	230	
GCTAAGCTTG	CTACAGTTTC	ATGTAAACTC	TAGTATCTAG	ACTATCACGT	GAG
HindIII					

Abbildung 18 (Fortsetzung)

3.5.4. Bestimmung des Transkriptionsstarts

Aus den in 3.5.3. erhaltenen Ergebnissen ist ersichtlich, daß die Nukleotide 8-112 der pgt1.5-Sequenz (Abb.10A) im 0.91kbp XbaI/ApaI-Fragment (Nukleotide 2221-2324, Abb.18B) lokalisiert sind. Dieses genomische Fragment und das 5'-aufwärts liegende 0.58kbp PstI/XbaI-Fragment hybridisieren, wie aus Abb.17B (Bahn 2 und 3) ersichtlich, an zwei RNAs (T3 und T1). Da diese 5'-Bereiche in pgt1.5 nur teilweise, in pgt1.3 nicht mehr vorhanden sind und so ein direkter Vergleich der Nukleotidsequenzen nicht möglich war, wurden Nuklease S1-Analysen mit genomischen Fragmenten durchgeführt, die nach den folgenden Kriterien ausgewählt wurden:

1) Aufgrund der vollständigen Übereinstimmung der aus vergleichbaren Bereichen der Tandem-Duplikation ermittelten Nukleotidsequenzen, wurden ausschließlich Fragmente aus dem D1-Bereich eingesetzt.

2) Innerhalb des 0.8kbp PstI-Fragments ist der Beginn der 1. Duplikation (ab Nukleotid 513, Abb.18B) lokalisiert. Das 3'-Ende der Transkripte (Polyadenylierungs-Signal in Position 5992) sowie das Ende der 1. Duplikation (Nukleotid 6147, Abb.18B) liegen unmittelbar vor dem Beginn der 2. Duplikation (ab Nukleotid 6162, Abb.18B). Daher müssen der Transkriptions-Start und die entsprechenden Promotor-Sequenzen innerhalb des 0.8kbp PstI-Fragments oder 3'-abwärts liegen. Würden diese Sequenzen 5'-aufwärts zum 0.8kbp PstI-Fragment liegen, wäre eine vergleichbare Transkription im Bereich der 2. Duplikation aufgrund der dann fehlenden Promotor-Sequenzen nicht möglich.

3) Aus einem Vergleich der Nukleotidsequenz des genomischen 0.91kbp XbaI/ApaI-Fragments mit der pgt1.5 cDNA-Sequenz konnte das 3'-Ende eines Exons (Nukleotid 2324, Abb.18B) festgelegt werden. Das 5'-Ende dieses Exons wurde jedoch nur über eine aus der genomischen Nukleotidsequenz ableitbaren Intron-Exon-Grenze (Nukleotid 2112/13) definiert und mußte deshalb mit der Nuklease S1-Analyse überprüft werden.

4) Zur Vervollständigung wurden die zwischen dem 0.8kbp PstI- und 0.91kbp XbaI/ApaI-Fragment liegenden Bereiche (0.58kbp PstI/XbaI- und 0.16kbp XbaI-Fragment) ebenfalls untersucht.

Anstelle des 0.91kbp XbaI/ApaI-Fragments wurde das vergleichbare

0.79kbp XbaI/EcoRI-Fragment aus pAT153-D (Abb.13B) isoliert, in M13mp19 kloniert und nach der in 2.5.2. beschriebenen Methode radioaktiv markiert. Das dabei erhaltene doppelsträngige XbaI/EcoRI-Fragment, in dem nur der zur RNA komplementäre Strang radioaktiv markiert ist, wurde zur S1-Analyse eingesetzt. Diese Methode wurde gewählt, da das Exon intern im Fragment lokalisiert war und somit endmarkierte Fragmente nicht verwendet werden konnten. Andererseits war nicht auszuschließen, daß weitere kodierende Bereiche im Fragment vorhanden waren, die mit endmarkierten Fragmenten ebenfalls nicht nachweisbar sind.

Das Ergebnis zeigt Abbildung 19C. Nachweisbar ist ein S1-resistentes Fragment mit einer Länge von 210 +/- 5 Nukleotiden. Diese Länge ist korrelierbar mit der theoretisch erwarteten Länge von 212 Nukleotiden, die aus dem Vergleich der cDNA und einer in der genomischen Sequenz gefundenen Spleißstelle ermittelt wurde. Dieses Exon liegt somit im genomischen Bereich zwischen den Nukleotiden 2112 - 2324 (Abb.18B). Da nur dieses eine geschützte Fragment nachgewiesen wurde, obwohl die Ergebnisse in 3.5.2. zeigen, daß im 0.91kbp XbaI/ApaI-Fragment kodierende Bereiche für zwei Transkripte liegen, muß dieses Exon von beiden RNAs (T3, T1) gemeinsam verwendet werden.

Die Analyse des 0.58kbp PstI/XbaI-Fragments wurde sowohl mit einzelsträngig markierten (siehe 2.5.2.) als auch mit an der XbaI-Stelle 5'-endmarkierten Fragmenten durchgeführt. In beiden Fällen wurde ein etwa 230bp langes S1-geschütztes Fragment nachgewiesen (Abb.19A,B). Die Position dieses Exons innerhalb des Fragments ließ sich durch die gleichzeitige Analyse mit dem 5'-endmarkierten Fragment (XbaI-Stelle markiert) festlegen (Nukleotide 1180 - 1418, Abb.18B). Da zusätzliche geschützte Fragmente nicht beobachtet wurden, konnte aufgrund der in 3.5.2. erhaltenen Ergebnisse dieses Exon ebenfalls zwei Transkripten (T3, T1) gemeinsam zugeordnet werden.

Bei der S1-Analyse des 0.8kbp PstI-Fragments wurden keine S1-geschützten Fragmente beobachtet. Daher mußten Promotor-Sequenzen und ein für zwei RNAs gemeinsamer Transkriptions-Start im PstI/XbaI-Fragment etwa 230bp 5'aufwärts von der XbaI-Stelle liegen.

Aus der Analyse des 0.16kbp XbaI-Fragments, in dem ebenfalls keine

geschützten Fragmente nachweisbar waren, wurde nicht deutlich, inwieweit sich das im 0.58kbp Pst/XbaI identifizierte Exon über die XbaI-Stelle hinaus in das 0.16kbp XbaI-Fragment erstreckt. Die Nukleotidsequenz zeigt in diesem Bereich zwei mögliche Spleißstellen (Nukleotide 1440/41 und 1492/93, Abb.18B). Die Spleißstelle in der Position 1492/93 wurde ausgeschlossen, da ein S1-geschütztes Fragment mit einer Länge von 74 Nukleotiden nicht nachgewiesen wurde. Deshalb wurde indirekt auf die Verwendung der Spleißstelle in Position 1440/41 geschlossen, da das zu erwartende Fragment mit einer Länge von 23 Nukleotiden unter den experimentellen Bedingungen (Hybridisierung bei 52°C/80% Formamid, 6%ige Polyacrylamidgele) vermutlich nicht nachzuweisen ist.

Ergänzt wurden die S1-Analysen durch eine "Primer-Extension"-Analyse. Ein Oligonukleotid (P2) (siehe 2.11.3.), mit einer zu den Nukleotiden 24-43 des kodierenden pgt1.5-cDNA Strangs (Abb.10A) identischen Nukleotidsequenz, wurde an polyA⁺-RNA hybridisiert und mit Reverser Transkriptase elongiert. Die Länge des erhaltenen Produkts wurde auf einem Polyacrylamid/Harnstoff-Gel analysiert. Das 5'-Ende des P2-Oligonukleotids liegt innerhalb des im 0.91kbp XbaI/ApaI-Fragment vorhandenen Exons (Position des Nukleotids 2256, Abb.18B). Da dieses Exon von zwei RNAs gemeinsam verdet wird, bestand die Möglichkeit den Transkriptionsstart für beide Transkripte zu ermitteln und eine eventuell bestehende Heterogenität der 5'-Enden zu analysieren. Eine Bestätigung der indirekt ermittelten Splice-Stelle in Position 1440/41 wurde ebenfalls möglich, da aus der Verwendung einer weiter 3'-liegenden Splice-Stelle eine sichtbare Verlängerung des Elongationsprodukts resultiert, abweichend von der aus der S1-Analyse ermittelten Länge von 420 (+/-10) Nukleotiden. Unter Berücksichtigung der Fehlergrenzen für die beobachteten Längen (+/- 20 Nukleotide) ist lediglich die größte Bande (420 Nukleotide) korrelierbar mit den Ergebnissen der Nuklease S1-Kartierung. Die vergleichbar schwache Intensität dieser Bande läßt vermuten, daß nur ein geringer Anteil der Synthese bis in diesen Größenbereich erfolgt. Daraus erklären sich auch die zusätzlich auftretenden Banden, die offensichtlich auf einen vorzeitigen Abbruch der Synthese aufgrund von RNA-Sekundärstrukturen zurückzuführen sind. Mit dieser Interpretation muß davon ausgegangen werden, daß für beide Transkripte derselbe Startpunkt sowie die Spleiß-Stelle in Position 1440/41 verwendet wird.

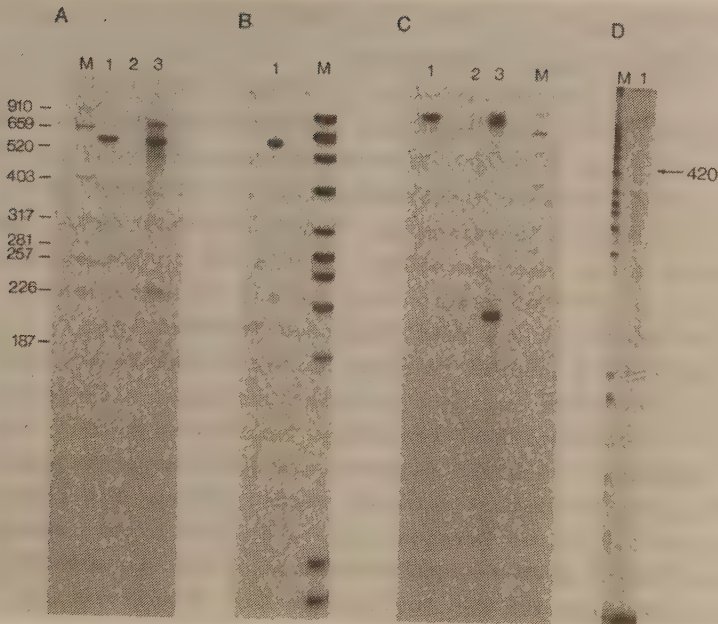


Abbildung 19 Nuklease S1-Kartierung und "Primer-Extension".

Die Nuklease S1-Kartierungen (A,B,C) wurden mit entsprechenden einzelsträngig markierten (siehe 2.5.2.) oder 5'-endmarkierten (siehe 2.5.4.) Fragmenten durchgeführt. Für die Kontrollen wurden jeweils identische Ansätze die Hefe tRNA enthielten verwendet.

Der Nachweis der Nuklease S1 geschützten Fragmente sowie der "Primer-Extensions"-Produkte erfolgte auf 6% Polyacrylamid/8M Harnstoff-Gelen. Als Längenstandard wurden 5'-endmarkierte pYH48/AluI-Fragmente (Bahn M) verwendet.

- A:** Das einzelsträngig markierte 0.58kbp PstI/XbaI Fragment (Bahn 1) wurde mit 5µg polyA⁺-RNA (0-4 Stunden Embryonen) (Bahn 3) oder 5µg Hefe-tRNA (Bahn 2) bei 49°C unter Standardbedingungen (siehe 2.9) hybridisiert und Nuklease S1 verdaut.
- B:** Das 5'-endmarkierte 0.58kbp PstI/XbaI-Fragment (XbaI-Stelle markiert) wurde wie in A hybridisiert und Nuklease S1 verdaut (Bahn 1).
- C:** Das einzelsträngig markierte 0.79kbp XbaI/EcoRI-Fragment (aus pAT153-D, siehe Abb. 13B) (Bahn 1) wurde mit 5µg polyA⁺-RNA (3.Larvenstadium) (Bahn 3) und 5µg Hefe tRNA (Bahn 2) bei 52°C unter Standardbedingungen hybridisiert und Nuklease S1 verdaut.
Die Belichtungszeit in A,B und C betrug jeweils 14 Stunden.
- D:** 50fmol 5'-endmarkiertes P2-Oligonukleotid (siehe 2.11.3.) (Spez. Akt. 5x10⁶ cpm/µg) wurde mit 5µg polyA⁺-RNA (3.Larvenstadium) bei 58°C hybridisiert. Das Oligonukleotid wurde wie in 2.10. beschrieben mit Reverser Transkriptase elongiert.
Belichtungszeit: 18 Stunden

3.5.5. Exon - Intron Organisation

In Abb.18B ist die aus den cDNA-Nukleotidsequenzen und den Ergebnissen der Nuklease S1-Kartierungen ermittelte Exon-Organisation der Transkriptionseinheiten D1 und D2 dargestellt. Abbildung 20 zeigt schematisch die Exon-Intron-Anordnung der sieben identifizierten Exon-Bereiche (E1 bis E7) in beiden Teilen der genomischen DNA-Duplikation und die aus der alternativen Verwendung der Exons 3 und 4 resultierenden Transkripte.

Die Nukleotidsequenzen vergleichbarer Fragmente aus den duplizierten Bereichen stimmen völlig überein, einschließlich der beiden 0.58kbpPstI/XbaI-Fragmente, in denen nach den Ergebnissen der Nuklease S1-Analyse (siehe 3.5.4.) Promotor-Sequenzen sowie der Transkriptionsstart vermutet werden müssen. Eine aktive Transkription der beiden Bereiche konnte deshalb nicht ausgeschlossen werden, jedoch gibt es auch keine Ergebnisse die ausschließen, daß nur ein Teilbereich der Duplikation zur Transkription verwendet wird.

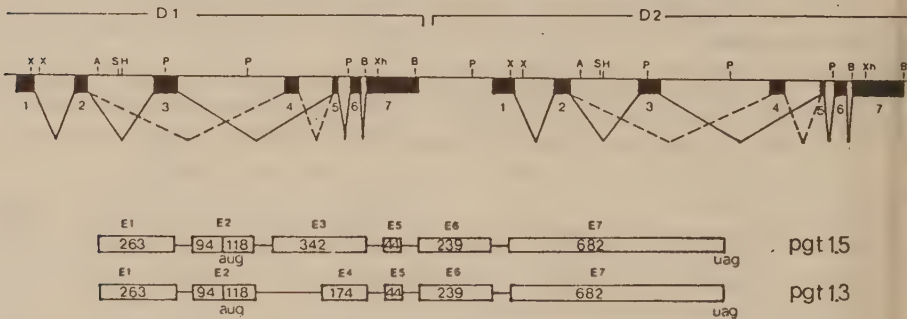


Abbildung 20 Schematische Darstellung der genomischen Exon/Intron Anordnung

Dargestellt ist die genomische Organisation der Exons 1-7 innerhalb der DNA-Tandem-Duplikation sowie die aus den entsprechenden Spleiß-Vorgängen resultierenden Transkripte (Die Zahlen geben die Länge der einzelnen Exons in Basenpaaren an).

In der genomischen Nukleotidsequenz sind mehrere Promotor-ähnliche Sequenzen (Position 1150-1155 und 1165-1170, Abb.18B) vorhanden die jeweils mit einem Transkriptionsstart (Position 1178 und 1193, Abb.18B) korrelierbar sind. Die möglichen Startpunkte liegen, unter Berücksichtigung der Fehlergrenzen für die aus der Nuklease S1-Analyse bestimmten Länge, noch innerhalb des ersten Exons (E1), so daß nicht definitiv entschieden werden kann welcher Start verwendet wird.

In Tab.1 sind zusammenfassend die Nukleotid-Sequenzen der Exon-Intron-Grenzen dargestellt. In allen Fällen wurde eine nahezu vollständige Übereinstimmung mit den für Introns beschriebenen 5'- und 3'-Konsensus-Sequenzen gefunden (Mount 1982; Keller & Noon 1985), insbesondere die konservativen 5'-GT und 3'-AG Dinukleotide sind für alle Spleißstellen vorhanden.

5'-Donor		3'-Acceptor	
GTPuAGT		(T/C) _n XAG	
Exon 1		Exon 2	
.. GCA GTG	[GTGAGT....IVS 1...CATTTTCAG]	TTC GCC ..	
Exon 2		Exon 3	
..AC CCA G	[GTGAGA....IVS 2...AATCAAAG]	AA AAC ..	
Exon 3		Exon 4	
..AT CAA G	[GTGCTG....IVS 3...AATCTTTAG]	GG ACG ..	
Exon 4		Exon 5	
..GC AGA A	[.....IVS 4...GCCCGCGCAG]	AT TCG ..	
Exon 5		Exon 6	
...CAC AAT	[GTGAGT....IVS 5...TCCGCTGCAG]	ATG TCG ..	
Exon 6		Exon 7	
..G CTC CT	[GTAAGT....IVS 6...CGCACCACAG]	T GGA	

Tab.1

3.6. Aminosäure-Sequenz

Um die Aminosäure-Sequenz zu ermitteln wurde die genomische Nukleotidsequenz (Abb.18B) auf Translations-Initiations-Kodons (AUG) untersucht. Exon 1 weist jedoch kein entsprechendes Triplet auf. Erst in Exon 2 sind zwei mögliche Start-Kodons in Position 2200 und 2207 vorhanden, wobei lediglich für das in Position 2207 liegende Kodon auch in den flankierenden Sequenzen eine Übereinstimmung mit den Konsensus-Sequenzen vorhanden ist, die für eukaryotische mRNAs beschrieben sind (Kozak 1984). Zum anderen erhält man nur bei Verwendung dieses Kodons - unter Berücksichtigung der alternativ verwendeten Exons 3 und 4 - einen durchgehenden, offenen Leserahmen für beide Transkripte (478 bzw. 386 Aminosäuren). Der Leserahmen wird durch den Austausch der Exons 3 und 4 in den folgenden Exons 5,6 und 7 nicht verändert und ergibt in diesem Bereich für beide Transkripte eine identische Aminosäuresequenz (Abb.21). Der Leserahmen wird durch ein in der Position 5977 liegendes Stop-Kodon (UAG) unterbrochen. Ein mögliches Polyadenylierungs-Signal (Proudfoot 1984, Birnstiel et al. 1985) wird im Abstand von 14 Nukleotiden (Position 5980) gefunden. Auch im folgenden Bereich finden sich Sequenzen, die charakteristisch für das 3'-Terminationssignal vieler eukaryotischer RNAs sind (G/T-Kluster, Birnstiel et al. 1985).

3.7. Untersuchungen an Shaker-Mutanten

3.7.1 Analyse genomischer DNA

Um zu untersuchen, in welchem Zusammenhang der duplizierte DNA-Bereich mit den Bruchpunkten der Shaker-Translokations-Mutanten steht, wurde gesamt genomische DNA aus Wiltyp-Fliegen und verschiedenen Sh-Translokations-Mutanten analysiert.

Für diese Analysen wurde hochmolekulare genomische DNA isoliert und mit Restriktionsendonukleasen verdaut. Die Fragmente wurden auf 0.8%igen Agarosegelen elektrophoretisch aufgetrennt und auf eine Nylonmembran transferiert. Die Hybridisierung erfolgte mit "nick translatiertem" *pchl*-Plasmid (Abb.13B). Dieses Plasmid ermöglicht einen Nachweis aller Fragmenten des duplizierten

TAT TGC GGT ATA TCG CGG GCT GCT ATT TTT TGC CTA ACC CGC TAC GCA CAC ACT GCG AAT
 ATT CGG CCA AAA ACA TAG TTA TAT TTT TGT CTG TGG GGT TTT AGA CAA ATT GTA AAC TGA
 TAG CTC CGG ACC CCA GCG GTT TAA CGG TGT CCA AAT TGA CAG TGC AAC CGG TGG AAC AGG
 TGG AGC ACA AGC AGC GGC ACC CAG AAG GAA ACC AGC GAT CCA GTC ACA ACA ATC GCT CGT
 TGA GAG CGC AGC GAT AAG AGT TCC AGA GTT TCT AGA GTT TCC AGC GAT ACC CAG CAG TGT
 TGG CCC CTT TGG TGG TGG CTT CTT CTT TTC CGC GCA AGC AGT TCC AAA AGC CGC TGG
 CCC TAC AGC GCA TCA TCA ACC GGC TGA TGC ACA ATT TGG CCC AGC AGC AGG AGT TCA TCA
 Met Trp Pro Thr Thr Arg Ser Ser Ser

GGA CGA CGC TGG CGG AGA GGA TCA AAG TGG AGC AGT TGA CGG CCA ATC TGT TCA ACA TCT
 Arg Arg Arg Trp Arg Arg Arg Ser Lys Trp Thr Ser Ser Ser Arg Pro Ile Cys Ser Thr Ser

ATC GCA AGT GGT GGC GCA CGG ATT CAC CCA
 Ile Ala Ser Arg Gly Ala Arg Ile His Pro

E3

GAA AAC ATC GCT GGG GAT GCT GCG CAG CGA TCT GTA GCT GGA GTC GCG CTG TCC CCA GCT
 Glu Asn Ile Ala Gly Asp Ala Ala Gln Arg Ser Val Ala Gly Val Arg Leu Ser Arg Ala

GTG CCA CGG CGG CTG CCA AGG GCG GCG GGT GAG GAT CGT GGT CAG GAT CGG GCG GCT GCT
 Val Pro Arg Ala Leu Arg Thr Ala Ala Gly Glu Asp Arg Gly Gln Asp Ala Gly Ala Ala

GTG GGG CAA ATA GCT GGA GCT AAC GGA GCT GCA GGA GTC GCG GCT GCG AGC GCG
 Val Gly Gln Ile Ala Gly Ala Asn Gly Ala Ala Gly Val Gly Thr Ala Ala Gly Thr Gly

ACC AAG GAG CAG GAG GAG CAC AGG GAG GTC CAG CTA AGC CGG GTC ACC AAA GAG CGG GAA
 Ser Lys Glu Glu Glu Glu His Arg Glu Val Gln Leu Ser Arg Val Thr Lys Glu Pro Glu

GGA GGG CCA CGG CGG CCA GTC CGC TTA CTG CTG CTG GAA GCA AGT CAA GAT CAA TAC GAT
 Arg Gly Arg Pro Ala Pro Val Arg Leu Leu Leu Leu Ala Ser Arg Asp Gln Tyr Asp

AGC ATC GGG CTT TGG CGT TTG GAC CAG CAA GTA AAC AAT CAA GAT
 Ser Ile Gly Leu Trp Arg Leu Asp Gln Gln Val Asn Asn Gln Asp

E4

GCG AGC CAG CTA ATG TAT ATA TAT CTT GTA TCT CCG ATC ATA TTG CAG GCA TAT AGC ATC
 Gly Thr His Leu Met Tyr Ile Tyr Leu Val Ser Pro Ile Ile Leu Gln Ala Trp Ser Ile

GCG GCG CGC GCT CAT AAT GGC ACA CGT GTC CGA GGG CTG TGC GAT AAA GCA GGT CCA GAT
 Gly Gly Ala Val His Asn Gly Thr Arg Val Arg Gly Leu Cys Asp Lys Ala Gly Arg Asp

CAA CAC GGT GGC CTC AGT TTC GCT GGC ATA GCC ACC AAT TGG TGC CGC AGC AAA AAT
 Gln His Gly Gly Leu Ser Phe Ala Gly Ile Ala Thr Asn Trp Cys Arg Ser Arg Asn

TGC TAC TCA GCG AGC GTG GGA CAT GCG GAT AAG CTG CAC AAT ATG CGG GAT AAC AAT GCA
 Ser Tyr Ser Ala Ser Val Gly His Ala Asp Lys Leu His Asn Met Pro Asn Asn Asn Ala

CTG GCG GCA CTC TGC GAT GGC ATG GTG AAG GCG TGG GAC ATC TAT GCA AAG CGG CAG GCG
 Leu Ala Gly Leu Cys Asp Gly Met Val Lys Ala Trp Asp Ile Tyr Ala Lys Pro Gln Ala

GTC AAT CTG TTC ATC ATC GAG GAT GTG TCG TAC AAC ATT TGC GAC CAG CGG TTC CAG GAG
 Val Ile Leu Phe Ile Ile Ile Glu Asp Val Ser Tyr Asn Ile Cys Asp Gln Arg Phe His Glu

TTC CAT ATT CGC GAG ACA TAT CCG CAC ATC AAG GTG CTG CGC CGC ACC CTC ACC GAG GTC
 Phe Tyr Ile Arg Glu Thr Tyr Pro His Ile Lys Val Leu Arg Arg Thr Leu Thr Glu Val

CAT CGG GAG GCG AAA CTG GGC CAG TCC AAG GAG TTG CTC CTT GGA TCC CAA GAG GTG GCG
 His Arg Glu Gly Lys Leu Gly Gln Ser Lys Glu Leu Leu Leu Gly Ser Gln Glu Val Ala

CTC ATC TAC TTC CGA GCT GGC TAC GAG CCC GGA CAC TAT CAC TCG CAG GCG GAT TGG GAT
 Val Ile Tyr Phe Arg Ala Gly Tyr Glu Pro Gly His Tyr His Ser Gln Ala Asp Tyr Asp

GCG CGC TAT CTG ATG GAG ACC TCG CTG GGC ATC AAG TGC CGG TCG ATT CAC TAC CAT TTG
 Ala Arg Tyr Leu Met Glu Thr Ser Leu Ala Ile Lys Cys Pro Ser Ile His Tyr His Leu

GCG GCG ACC AAG AAG GTG CAG CAG GCA TTG GCG CAG CGC GCG GTG CTG GAG GGT TTA TCA
 Ala Gly Thr Lys Lys Val Gln Gln Ala Leu Ala Gln Pro Ala Val Leu Glu Arg Leu Ser

ACG ATC CGG AGG AGA TCA AGG CGG TGG GCA AGA TCT TCA CGG GTC TCT ACT CGC TGG AGC
 Thr Ile Arg Arg Arg Ser Arg Arg Trp Ala Arg Ser Ser Arg Val Ser Thr Arg Trp Thr

ACA AGG AGG CGG GCA ATG CCA GGT AGG AGA TGG GGT GGT CAC TCG GCA GAT ATT GGT GGT
 Thr Thr Arg Arg Ala Met Pro Ala Thr Arg Trp Arg Ala His Ser Gly Glu Ile Arg Ala

GAA GCG GCA GCG CGA GGA GCG GCG AAT AAT GTC TAC GCG GTG GAT ATA CCA GAT GCA CTA
 Glu Ala Ala Ala Arg Gly Gly Gly Asn Asn Val Tyr Gly Val Asp Ile Pro Asp Ala Leu

AAG CGC ATG TCA CGC GTG GAG CCG TCC GCG TGG ATT CTG ATG CAT CTG ATT CAT CGC CGG
 Lys Arg Met Ser Arg Val Glu Pro Ser Ala Trp Ile Leu Met Asp Leu Ile His Pro Pro

CTG ACC AAG GGC TAT ATG GTG GCG CCC GGT GGC GAT ATG CGC CGC CAG ATC GTG CAG ATG
 Leu Thr Lys Gly Tyr Thr Met Val Arg Pro Gly Gly Asp Met Pro Pro Gln Ile Val Arg Met

GTG TCG GAG CTG GCG ATC TTC GGT GTG GTG ATC GGA GAT GCG GAG CAC ATT GTG CAG AAC
 Val Ser Glu Leu Gly Ile Phe Gly Val Val Ile Gly Asp Ala Glu His Ile Val His Asn

TAC CAG GCG GGA CAC ATC GTG GCG ACA AAG CTG TCA ACC GCG AAC GAA GGA GCG GTG GCA
 Tyr Gln Ala Gly His Ile Val Arg Thr Lys Leu Ser Thr Ala Asn Glu Gly Gly Val Ala

GCG GGT CTG GCG GCG CTG GAG AGT CCA TAT CTG ATC GAT AGC GAT CAC GAG GAT GAG CAG
 Ala Gly Leu Gly Ala Leu Asp Ser Tyr Leu Ile Asp Ser Asp Asp Glu Asp Glu Gln

AAG TAG TAT GCT TTA AGC AGA TAA AGT TCG CGG AAT AAT TC
 Lys ***

Abbildung 21 Aminosäuresequenz

Die Pfeile bezeichnen die Spleißstellen für die Exons 3 und 4.

Bereichs. Die Analysen wurden von A. Baumann zur Verfügung gestellt.

In der DNA der beiden verwendeten Wildtyp-Stämme (Oregon R und Canton S) wurden nach Restriktion mit SstI in Übereinstimmung mit der Restriktionskarte des genomischen Bereichs ein 3.5kbp- und 7.4kbp-Fragment gefunden (Abb.22). Ein zusätzliches Fragment, das den folgenden Bereich ausgehend von der SstI-Stelle repräsentiert, wurde nicht beobachtet. Da innerhalb des λ EO.7-Phagen (siehe Abb.1), der das Ende des isolierten genomischen Bereichs darstellt, keine SstI-Restriktionsstelle kartiert wurde, muß die nächste SstI-Stelle mindestens 20kbp entfernt liegen. Fragmente mit einer Länge von über 15kbp wurden auf den durchgeführten Blots, vermutlich aufgrund des verminderten DNA-Transfers, jedoch nicht nachgewiesen.

Die DNA der Translokations-Mutanten W32 und V7, deren chromosomalen Bruchpunkte distal zum B55-Bruchpunkt liegen und damit relativ entfernt vom untersuchten genomischen Bereich lokalisiert sind, zeigte erwartungsgemäß im Bereich der DNA-Duplikation keine Abweichung zur Wildtyp-DNA. In B55-DNA hingegen wurde ausschließlich das 3.5kbp-Fragment nachgewiesen. Dieses Ergebnis ließ vermuten, daß die beobachtete Veränderung der DNA nicht auf eine Beteiligung des B55-Bruchpunkts sondern auf eine Deletion, die das 7,4kbp Fragment einschließt, oder auf den Verlust einer SstI-Restriktionsstelle (Restriktionspolymorphismus) zurückzuführen ist. Eine definitive Aussage ist nicht möglich, da der flankierende zum 7.4kbp Sst-Fragment liegende Bereich aufgrund der Länge bei dieser Analyse nicht erfaßt wurde. Aus diesem Grund wurde eine identische Analyse mit HindIII-geschnittener DNA durchgeführt (Abb.22B). In Wildtyp-DNA wurde in Übereinstimmung mit der Restriktionskarte ein 4.8kbp- und ein 7.4kbp-Fragment beobachtet. Im Gegensatz dazu wurde in B55- und B132-DNA das 7.4kbp-Fragment nicht gefunden. Unterschiede zwischen B55- und B132-DNA wurden nicht beobachtet. Ein Einfluß des B55-Bruchpunkts für den untersuchten genomischen Bereich wurde somit ausgeschlossen, da beide Mutanten aus einem Fliegenstamm isoliert wurden und bis auf die unterschiedlichen Bruchpunkte identisch sind, wobei jedoch nur B55 den Schaker-Phänotyp aufweist.

Insgesamt wurde aufgrund dieser Analyse auf eine 7.5kbp Deletion

in der B55- und B132-DNA geschlossen, wobei jedoch zwei Möglichkeiten existieren, die mit den vorliegenden Ergebnissen nicht zu unterscheiden sind. Dieser Punkt wird in der Diskussion näher erläutert.

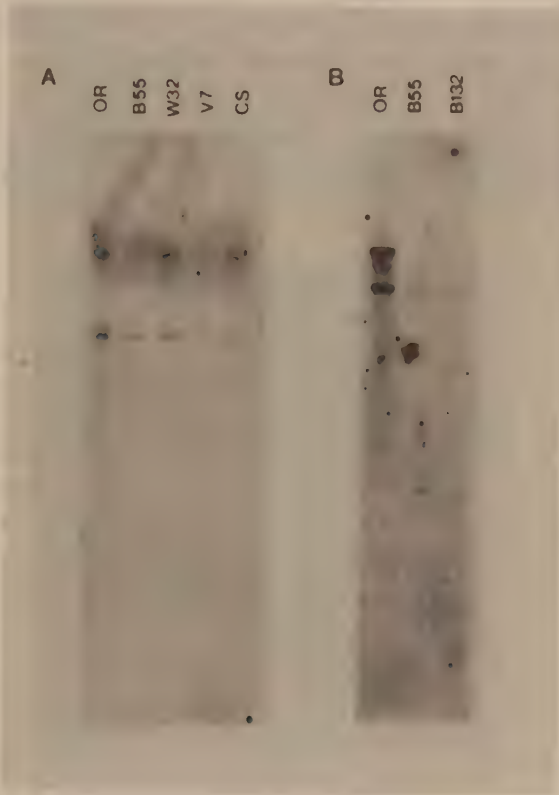


Abbildung 22

Je 5 μ g gesamt-genomische DNA aus Wildtyp-Fliegen (CS, Canton S, OR, Oregon R) und den angegebenen Translokations-Mutanten wurden mit SstI (A) oder HindIII (B) geschnitten, auf 0.7%igen Agarosegelen fraktioniert und auf Nylonmembranen transferiert. Die Hybridisierung (12 Stunden, 65°C) erfolgte mit 8×10^4 cpm/ml des "nick translatierten" pch⁺-Plasmids (spez. Akt. 5×10^6 cpm/ μ g).
Belichtungszeit: 4 Tage

3.7.2. Transkriptanalyse

Zur Analyse der Transkripte in Sh-Mutanten wurden "Northern"-Blots mit polyA⁺-RNA aus adulten Wildtyp- und Mutanten-Fliegen (jeweils selektierte männliche Fliegen) hergestellt und mit pgt1.5-cDNA hybridisiert. Zwischen den Mutanten wurden keine Unterschiede beobachtet (Abb.23), in jedem Fall wurden die Transkripte T1 und T2 nachgewiesen. Im Gegensatz zur RNA aus Wildtyp- Fliegen, wurde die T3-RNA in den Mutanten jedoch nicht beobachtet.

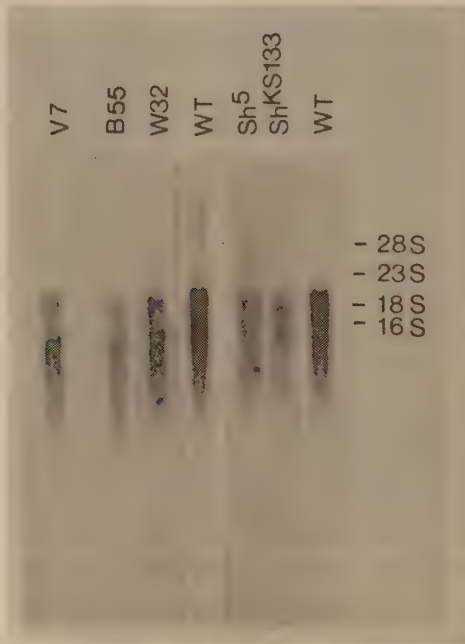


Abbildung 23

Jede Zug polyA⁺ RNA aus Wildtyp-Fliegen (männliche und weibliche Fliegen) und den angegebenen Mutanten (nur männliche Fliegen) wurden auf Formaldehyd/Agarosegelen fraktioniert und auf Nylonmembranen transferiert. Die Hybridisierung erfolgte mit 5×10^6 cpm/ml "nick translatisierter" pgt1.5-cDNA (Spez. Akt. 3×10^8 cpm/ μ g). Belichtungszeit: 3 Tage

4. Diskussion

Die Organisation der Gene im Shaker-Komplex (Sh-C) ist weitgehend ungeklärt. Befunde, die aus den elektrophysiologischen und genetischen Untersuchungen der Shaker-Mutanten erhalten wurden, deuten daraufhin, daß eine Relation zu Strukturgenen des frühen, transienten spannungsabhängigen K-Kanals vorhanden ist (Tanouye et al. 1981).

Eine molekulare Analyse der Gene, die an der Ausbildung des Shaker-Phänotyps beteiligt sind, ist bisher nicht erfolgt. So ist völlig unklar, ob die im Sh-C cytogenetisch separierbaren Mutationen verschiedene Gene einer Genfamilie beeinflussen oder in unterschiedlichen Bereichen einer relativ ausgedehnten Transkriptionseinheit eines einzelnen Gens liegen, wie dies für ähnlich komplex strukturierte Gen-Loci gezeigt werden konnte (Kidd et al. 1983).

Die in dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen konzentrieren sich auf den durch den Mc λ -Phagen repräsentierten genomischen DNA-Bereich. Durch cytogenetische Analysen wurde dieser Bereich distal zum B55-Bruchpunkt, und somit innerhalb des genetisch definierten Maternalen-Effekt (ME)-Bereichs lokalisiert. Dies wird durch Untersuchungen bestätigt, die zeigen, daß der distale Bruchpunkt der Translokation T(X,3)JC153 etwa 90kbp distal zum untersuchten Bereich lokalisierbar ist (A. Baumann, persönliche Mitteilung).

Aus den genetischen Daten sind keine Rückschlüsse auf die Gesamtlänge der DNA im ME-Bereich (zwischen JC153- und B55-Bruchpunkt) möglich. Da die Distanz zwischen B55 und den dominanten Shaker-Mutanten gleichermaßen unklar ist, kann letztlich aus der Position des untersuchten DNA-Bereichs keine Aussage auf seine Bedeutung für den Shaker-Phänotyp getroffen werden.

Aus den Transkriptanalysen (Abb.2B) des distal zur adm-Transkriptionseinheit gelegenen genomischen Bereichs (6.5kbp EcoRI/BamHI-Fragment, Abb.1) konnte auf die Existenz von vier Transkripten geschlossen werden, die aufgrund der stadienspezifischen Expression jedoch keine Identität zu den adm-Transkripten aufwiesen. Eine detaillierte Untersuchung dieser Transkripte wurde durch die Isolierung von cDNA-Klonen aus einer larvalen λ gt10-cDNA Bibliothek möglich. Für beide cDNA-Klone (pgt1.5 und pgt1.3) besteht

eine weitgehende Identität in der Nukleotidsequenz, wie durch Hybridisierungsexperimente gezeigt wurde. Unterschiede wurden erst aus einem Vergleich der Nukleotidsequenzen deutlich. Neben einem über 910bp identischen 3'-Ende sind nicht-homologe Bereiche an den 5'-Enden vorhanden (Abb. 10A, B).

Die mit der pgt1.5-cDNA nachweisbaren Transkripte (Abb. 11A) sind qualitativ und quantitativ vergleichbar mit den T1-, T2- und T3-Transkripten, die im genomischen EcoRI/BamHI-Fragment gefunden wurden (Abb.2A). Dies zeigte einerseits die Spezifität der isolierten Klone für den untersuchten genomischen Bereich zum anderen mußte eine ausgeprägte Homologie der Transkripte T1,T2 und T3 untereinander bestehen. Diese Homologien sind nicht auf den 3'-Bereich beschränkt, da auch die 5'-Region der pgt1.5-cDNA Bereiche enthält, die homolog zu allen drei Transkripten sind (Abb.12). Aufgrund dieser Ähnlichkeit der Transkripte untereinander war eine Zuordnung zu den einzelnen cDNA-Klonen nicht unmittelbar möglich. Da jedoch nur die Transkripte T1 und T2 in RNA des 3. Larvenstadiums nachweisbar sind (Abb. 11A) und auch die Klon aus einer cDNA-Bibliothek des 3.Larvenstadiums isoliert wurden, konnte auf eine mögliche Zugehörigkeit der cDNA-Klone zur T1-und T2-RNA geschlossen werden. Im 3.Larvenstadium ist im Vergleich zum 4-20 Stunden Embryonalstadium eine deutliche Erhöhung der Transkriptmenge zu beobachten. Dies kann ein möglicher Grund dafür sein, daß aus einer gleichen Anzahl Phagen der 4-7 Stunden Embryonalen λ gt10-cDNA Bibliothek entsprechende cDNA-Klone nicht isoliert werden konnten.

Die durch Verwendung des EcoRI/BamHI-Fragments aus der "Kopf"-cDNA Bibliothek isolierte pc7-90-cDNA ist einer 1.0kb RNA (T7) zuzuordnen, für die eine starke Expression in Oocyten und Adulten Entwicklungsstadien zu beobachten ist (Abb. 11B).

Durch Hybridisierung der cDNA an genomische Fragmente wurden zwar entsprechende homologe DNA-Bereiche identifiziert (Abb.14D, Abb.15), die genomische DNA-Nukleotidsequenz zeigte allerdings keine Übereinstimmung mit der cDNA-Nukleotidsequenz. Da zudem eine Relation der T7-RNA zu den im EcoRI/BamHI Fragment nachweisbaren Transkripten nicht bestand, wurde vermutet, daß dieses Transkript nicht in diesem Bereich kodiert wird und der cDNA-Klon lediglich aufgrund unspezifischer, partieller Homologien im EcoRI/BamHI-

Fragment isoliert wurde. Diese Annahme wurde durch eine *in situ*-Hybridisierung der pc7-90-cDNA an polytäre Speicheldrüsen-Chromosomen bestätigt. Die pc7-90-DNA hybridisierte ausschließlich im Bereich 28C auf dem zweiten Chromosom (A.Baumann, persönliche Mitteilung).

Aussagen zur Exon/Intron Organisation der cDNA-zugehörigen Transkripte wurden aus der genomischen Nukleotidsequenz erhalten. Durch einen Vergleich mit der pgt1.5-cDNA Sequenz konnten drei genomische Exon-Bereiche (E5,E6,E7, Abb.20) direkt zugeordnet werden. Diese drei Exons repräsentieren den in pgt1.5 und pgt1.3 identischen 910bp 3'-Bereich. In der genomischen Nukleotidsequenz des Bereichs, der 3'-abwärts auf Exon 7 folgt, ist ein mögliches Polyadenylierungs-Signal (GATAAA) vorhanden, das jedoch nicht völlig mit den normalerweise gefundenen Signalen übereinstimmt (AATAAA, Proudfoot 1984). Bis in diesen Bereich erstreckt sich auch die pgt1.3 cDNA (Abb.10B). Der für diese cDNA gefundene offene Leserahmen endet an einem Stop-Kodon (UAG) 14 bp vor diesem möglichen Polyadenylierungs-Signal. Im darauf folgenden genomischen Bereich sind charakteristische G/T-Kluster vorhanden, die in eukaryotischen Genen häufig Terminationsignale für die Transkription darstellen (Birnstiel et al. 1985).

Da aus dem in pgt1.5 und pgt1.3 weitgehend identischen offenen Leserahmen auf eine gemeinsame Verwendung des Stop-Signals geschlossen werden konnte, wurde letztlich für die cDNA-zugehörigen Transkripte eine gemeinsame 3'-Terminationstelle angenommen.

Die divergierenden Nukleotidsequenzen im 5'-Bereich der beiden cDNA-Klone wurden in zwei aufeinanderfolgenden genomischen PstI-Fragmenten lokalisiert. Die zur pgt1.5 cDNA homologe genomische Sequenz beginnt in einem 1.3kbp PstI-Fragment und erstreckt sich bis in das 5'-aufwärts angrenzende 0.65kbp HindIII/PstI-Fragment (Exon 3, Abb.20). Das nächste 5'-aufwärts folgende Exon 2, dem die Nukleotide 10 - 112 der pgt1.5 Nukleotidsequenz (Abb.10A) entsprechen, liegt innerhalb eines 1.65kbp XbaI/ApaI-Fragments. Die Nukleotidsequenz dieses Exons kann jedoch nicht als ausschließlich pgt1.5-spezifisch angesehen werden, da mit diesem Teilbereich der cDNA (250bp EcoRI/PstI-Fragment) in RNA aus adulten Fliegen eine Hybridisierung an die T1-, T2- und T3-RNA gefunden wurde (Abb.12). Da mindestens eines dieser Transkripte zur pgt1.3-cDNA gehört,

mußte angenommen werden, daß pgt1.3 zugehörige Sequenzen ebenfalls im 1.65kbp XbaI/PstI Fragment liegen. Dies ließ sich aufgrund der unvollständigen Länge des Klons jedoch nicht unmittelbar zeigen. Das 5'-Ende der pgt1.3 cDNA (Nukleotide 6-128, Abb.11B) mußte aufgrund der Hybridisierungs-Ergebnisse (Abb. 14C) im 1.6kbp PstI-Fragment lokalisiert sein. Aus der Sequenzierung der Enden dieses Fragments wurde keine Homologie zu pgt1.3 gefunden. Die homologen Bereiche mußten somit intern im Fragment liegen. Aus diesem Grund wurde ein Oligonukleotid (P1, siehe 2.11.3.) mit einer zu den Nukleotiden 22-39 der pgt1.3 cDNA (Abb.10B) komplementären Nukleotidsequenz synthetisiert und zur Sequenzierung des 1.6kbp PstI-Fragments eingesetzt. Damit wurde ausgehend von dem intern im Fragment liegenden pgt1.3-homologen Bereich eine Nukleotidsequenz erhalten, wobei die ersten beiden lesbaren Basen der Sequenz mit den Nukleotiden 10 und 11 der pgt1.3 Sequenz (Abb. 10B) übereinstimmten. Damit war einerseits die Position des Exons 4 im 1.6kbp PstI-Fragment bestätigt, zum anderen wurde in der zusätzlich erhaltenen Nukleotidsequenz eine Spleiß-Konsensus-Sequenz gefunden, die vermutlich das 5'-Ende dieses Exons repräsentiert. Der Gebrauch dieser Exon/Intron-Grenze (Nukleotide 4478/88, Abb. 18B) wurde als wahrscheinlich angesehen, da auf diese Weise im folgenden DNA-Bereich ein offener Leserahmen erhalten wird, der ohne Veränderung in den für die pgt1.3-cDNA gefundenen Leserahmen übergeht.

Die Größe sowie die genomische Anordnung der Exons 1 und 2 wurde über die Nuklease S1-Kartierungen ermittelt (Abb.19). Die 3'-Grenze des Exons 2 (Nukleotid 2324, Abb.18B) wurde aus dem Sequenzvergleich mit der pgt1.5 Nukleotidsequenz festgelegt. Die aus der Nuklease S1-Kartierung ermittelte Gesamtlänge des Exon 2 (212 Nukleotide) war exakt korrelierbar mit einer in der genomischen Sequenz vorliegenden 5'-Exon/Intron-Grenze (Nukleotid 2112/13). Für Exon 1 konnte lediglich der innerhalb des 0.58kbp PstI/XbaI-Fragments liegende Bereich - und damit das 5'-Ende der mRNA - bestimmt werden, jedoch liegt das 3'-Ende des Exons nicht innerhalb dieses Fragments. Dieses 3'-Ende konnte letztlich nur im 0.16kbp XbaI-Fragment lokalisiert sein, da im 0.91kbp XbaI/ApaI-Fragment keine transkribierten Bereiche außerhalb des Exon 2 nachweisbar waren. Ein S1-geschütztes Fragment wurde in der durch-

geführten Nuklease S1-Kartierung nicht nachgewiesen. In der genomischen Nukleotidsequenz ist jedoch eine perfekte Spleiß-Konsensussequenz (GTGAGT , Nukleotide 1441 - 1446, Abb. 18B) 23bp von der XbaI-Restriktionsstelle entfernt vorhanden. Ein derart kurzes Fragment ist unter den experimentellen Bedingungen (Hybridisierung bei 52°C/80% Formamid und 6% Polyacrylamid-Gele) nicht nachzuweisen.

Das 5'-Ende des Exons 1 wurde anhand der Nuklease S1-Kartierung mit einer Genauigkeit von +/- 10 Nukleotiden eingegrenzt (Abb.19). Innerhalb des 5'-Endes liegen verschiedene Transkriptions-Startsequenzen. Ausgehend von zwei A-Nukleotiden (Nukleotid 1178 und 1193, Abb.18B), die in den flankierenden Sequenzen mit den für eukaryotische mRNA gefundenen Start-Sequenzen übereinstimmen (PyPyCAPyPyPy, Corden et al. 1980), sind im üblichen Abstand von 27-30 Nukleotiden Promotor-ähnliche ("TATA-Box", Corden et al. 1980) Sequenzen (Nukleotide 1150-1155 und 1165-1170, Abb.18B) sowie 5'-aufwärts (-120/-130 Nukleotide) "CAT-Box" ähnliche Sequenzen (Dierks et al. 1983) zu finden. Da sowohl Exon 1 als auch Exon 2 Homologien zu zwei Transkripten aufweisen (Abb. 17B) konnte auf eng beieinander liegende oder sogar identische Transkriptions-Starts geschlossen werden. Unabhängig vom verwendeten Transkriptions-Start kann innerhalb von Exon 1 in keinem der möglichen Leseraster ein durchgehender, offener Leserahmen formuliert werden, so daß offensichtlich eine etwa 250bp nicht-translatierte Region vorhanden ist.

Insgesamt können aus der Exon/Intron-Organisation, unter Berücksichtigung der sich gegenseitig ausschließenden, alternativen Verwendung der Exons 3 und 4, nur zwei Transkripte generiert werden (Abb.20). Eine Zuordnung der cDNA-Klone ist aufgrund der Hybridisierungs-Experimente mit dem Exon 3 (spezifisch für pg1.5) und Exon 4 (spezifisch für pg1.3) eindeutig nur für die in Oocyten RNA vorhandene T3- und T1-RNA möglich (Abb. 17B, Bahn 4 und 5). Das zusätzlich in RNA aus adulten Fliegen vorhandene dritte Transkript (T2), das ebenfalls in RNA des 3. Larvenstadiums nachweisbar ist, steht im Widerspruch zur gefundenen Exon/Intron-Organisation. Neue Ergebnisse lassen jedoch vermuten, daß tatsächlich nur die T1- und T2-RNAs von dieser Transkriptionseinheit

generiert werden. Die in Oocyten-RNA nachweisbaren Transkripte T3 und T1 repräsentieren letztlich nur verlängerte Formen der in adulten Fliegen vorliegenden T1- und T2-Transkripte. Damit ist eine Neudefinition der bisherigen Nomenklatur für diese Transkripte erforderlich. In RNA aus adulten männlichen Fliegen sind ausschließlich die T1- und T2-RNA nachweisbar, während in RNA aus einer gemischten Populationen adulter männlicher und weiblicher Fliegen zusätzlich die T3-RNA beobachtet wird. Dies kann auf die in den gemischten Populationen zusätzlich vorhandene Oocyten-RNA zurückgeführt werden, in der jeweils die verlängerten Formen der T1- und T2-RNA (bisher in Oocyten mit T3 und T1 bezeichnet) vorliegen. Das Erscheinen von nur drei Banden statt der zu erwartenden 4 Banden in den gemischten RNA-Populationen ist auf eine zufällig gleiche Länge des bisher mit T1 bezeichneten kürzeren Oocyten-Transkripts (entspricht der verlängerten Normalform der T2-RNA, die in den adulten Stadien beobachtet wird) und der in den adulten Stadien vorliegenden Normalform der T1-RNA zurückzuführen. Dies ist übereinstimmend mit der Beobachtung, daß in RNA gemischter Populationen aus späten Puppen und adulten Stadien ein stärkeres Hybridisierungs-Signal für die T1-RNA (diese Bande enthält die Normalform des T1-Transkripts und die in Oocyten-RNA verlängert vorliegende Form der T2-RNA), verglichen mit der T2-RNA beobachtet wird (Abb.11A).

Die Ursache für die Verlängerung der Oocyten-Transkripte ist unbekannt. Denkbar wäre eine Verlängerung der polyA-Enden, die in vielen Fällen zur Stabilisierung von RNAs notwendig ist (Zeevi et al. 1982, Huez et al.1981).

Mechanismen, die die Ausbildung strukturell unterschiedlicher RNAs von einer einzigen Transkriptionseinheit ermöglichen, sind für eine Vielzahl eukaryotischer Gene beschrieben (Rozek & Davidson 1983, Nabeshima et al. 1984, Periasamy et al. 1984, Falkenthal et al. 1985, Medford et al 1985, Karlik & Fyrberg 1985). In vielen Fällen kann dies auf die Verwendung verschiedener Promotoren bzw. Transkriptionsstarts (Nabeshima et al. 1984, Periasamy et al. 1984) oder auf unterschiedliche Termination in den 3'-nicht-translatierten Regionen (Rosenfeld et al. 1984, Ruiz-Opazo et al. 1985, Henikoff et al. 1983, Telford et al. 1985) zurückgeführt werden.

Die von Schwarzbauer (1983) beschriebene variable Auswahl verschiedener in einem einzelnen Intron vorhandener 3'-Spleißstellen und das Herausschneiden eines spezifischen Exons (Nawa 1984) sind zusätzliche Möglichkeiten um unterschiedliche RNAs zu generieren. Im Gegensatz dazu muß zur Bildung der T1- und T2-RNA ein Mechanismus angenommen werden, der eine sich gegenseitig ausschließende Benutzung des Exons 3 oder 4 ermöglicht. Ein vergleichbarer alternativer Spleißvorgang ist für die Bildung der verschiedenen Troponin T RNAs in Ratten verantwortlich (Medford et al. 1984). Für *D. melanogaster* sind entsprechende Beispiele bisher nicht beschrieben.

Hinsichtlich der genomischen Anordnung ist dieser Fall insofern interessant, da das zwischen den Exons 3 und 4 liegende Intron nicht exklusiv, sondern nur zusammen mit Exon 4 und dem folgenden Intron zur Ausbildung der T1-RNA beziehungsweise nur mit Exon 3 und dem davorliegenden Intron zur Ausbildung der T2-RNA herausgeschnitten wird (Abb. 20). Durch ein exklusives Herausschneiden des zwischen Exon 3 und 4 liegenden Introns würde ein Transkript generiert, welches Exon 3 und 4 gemeinsam enthält. Ein derartiges Transkript wird jedoch nicht nachgewiesen und ist entweder nicht vorhanden oder liegt nur in geringer Menge vor (Abb. 17B, Bahn 4 und 5). Der oben beschriebene Spleiß-Vorgang kann somit als der vorherrschende Mechanismus angesehen werden.

Eine Entwicklungs- und Gewebespezifische Regulation für Transkripte, die durch alternative Spleißvorgänge generiert werden, ist für die α -Tropomyosin- (Karlik & Fyrberg 1985, Ruiz-Opazo et al. 1985) und Troponin T- Gene (Medford et al. 1984, Breitbart et al. 1985) nachgewiesen. Aus den im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Analysen läßt sich lediglich eine Aussage über die Entwicklungsspezifität der T1- und T2-RNA ableiten, da stets RNA aus ganzen Tieren und nicht aus isolierten Geweben verwendet wurde. Aus dem Entwicklungsprofil ist eine deutliche Akkumulation der Transkripte (T1 und T2) in Oocyten und im 0-4 Stunden Embryonalstadium zu erkennen (Abb. 11A). Beide Transkripte sind somit maternal und werden bereits während der Oogenese vom mütterlichen Genom transkribiert. In den späteren Embryonalstadien (4-20h) sowie im 1. Larvenstadium ist die Transkriptmenge stark vermindert. Ein deutliches Expressions-Maximum liegt für beide Transkripte im

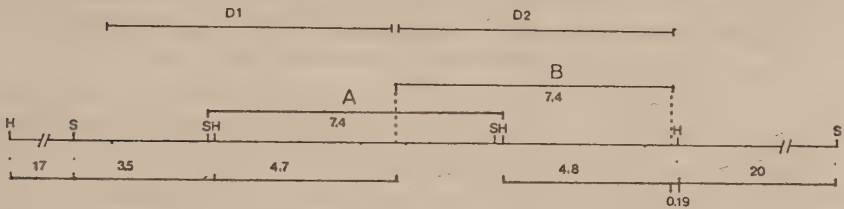
2. und frühen 3. Larvenstadium. In den folgenden Stadien (spätes 3. Larvenstadium und frühe Puppen) ist die Transkriptmenge reduziert und steigt erst in späten Puppen und Adulten Fliegen etwas an. Für die T1- und T2-RNA ist somit eine deutliche Regulation während der Entwicklung vorhanden, die für beide Transkripte identisch verläuft.

Um die Eigenschaften der aus den T1- und T2-Transkripten resultierenden Proteine zu analysieren, wurde die Aminosäure-Sequenz aus den vorliegenden Nukleotidsequenzen abgeleitet. Dabei wurde ein innerhalb von Exon 2 lokalisiertes Translations-Start-Kodon (AUG) verwendet (Nukleotide 2207-2209, Abb.18B). Dieses AUG ist das einzige, welches einen durchgehenden offenen Leserahmen für beide Transkripte liefert, unabhängig davon ob Exon 3 oder 4 verwendet wird. Die resultierenden Aminosäure Sequenzen sind außer in den Bereichen, die von den Exons 3 und 4 kodiert werden, für beide Transkripte identisch (Abb.21).

Hydrophobe, helicale Bereiche, wie sie beispielsweise in Membran-assoziierten Proteinen, wie dem Acetylcholin-Rezeptor (Noda et al. 1982) oder dem spannungsabhängigen Na-Kanal (Noda et al. 1984) gefunden werden, sind nach den mit dieser Aminosäuresequenz durchgeführten Hydrophatit-Analysen (Kyte & Doolittle 1982) auszuschließen. Lediglich die Protein-Domäne, die durch das Exon 4 repräsentiert wird, weist einen hydrophoben Bereich mit einer Länge von 24 Aminosäuren auf (Abb.21). Der Hydrophatit-Index liegt jedoch unter dem Wert (+1.6) der für Transmembran-Bereiche beschrieben ist.

Einige interessante Aspekte ergeben sich aus der genomisch duplizierten Anordnung des T1/T2-Gens. So sind im Wildtyp-Genom zwei aufeinanderfolgende, in den sequenzierten Teilen völlig identische 7.4 kbp DNA Bereiche nachweisbar, die lediglich durch 14 Nukleotide (Position 6148-6161, Abb.18B) voneinander getrennt sind. In jedem dieser duplizierten DNA-Bereiche ist eine vollständige Transkriptions-Einheit einschließlich der Promotor-Bereiche vorhanden. Ein Unterschied zur genomischen Anordnung des T1/T2- Wildtyp-Gens wurde für die Translokations-Mutanten B55 und B132 festgestellt. In diesen Mutanten ist die Deletion eines 7.4kbp langen Fragments

zu beobachten (Abb.22). Wie im folgenden gezeigt wird, sind zwei Möglichkeiten für eine 7.4kbp-Deletion vorhanden, die mit den in 3.7.1. gefundenen Ergebnissen jedoch nicht zu unterscheiden sind:



Unabhängig davon, ob das 7.4kbp SstI/HindIII-Fragment (A) oder der gesamte D2-Bereich (Fragment B), der ebenfalls eine Länge von 7.4 kbp aufweist, deletiert ist, wird in der SstI-geschnittenen DNA ausschließlich ein 3.5kbp-Fragment nachgewiesen, da das folgende SstI-Fragment sowohl bei einer Deletion des Fragments A als auch des Fragments B im Größenbereich von mindestens 25kbp liegt und damit unter den experimentellen Bedingungen nicht nachzuweisen ist. In der mit HindIII-geschnittener DNA durchgeführten Analyse wurde für B55 und B132 lediglich ein etwa 4.8kbp langes Fragment beobachtet. Bei einer Deletion des Fragments A ist dies ein HindIII-Fragment, welches sich von der im D2-Bereich vorhandenen HindIII-Stelle bis zu einer außerhalb von D2 liegenden HindIII-Stelle erstreckt, die etwa 190bp vom D2-Ende entfernt ist. Bei der Deletion des Fragments B wird ebenfalls ein etwa 4.8kbp langes HindIII-Fragment generiert. Dies ergibt sich aus der Summe eines 4.7kbp langen Bereichs, der sich von der in D1 liegenden HindIII-Restriktionsstelle bis zum Beginn des D2-Bereichs erstreckt und des 0.19kbp Bereichs zwischen dem D2-Ende und der nächsten HindIII-Stelle.

Unter der Voraussetzung, daß im Wildtyp-Genom von beiden Genen gleichermaßen die Transkription der T1- und T2-RNA erfolgt, hat der Verlust des Fragments A oder B in den Mutanten letztlich nur einen Effekt auf die Transkriptmenge. Der Grund dafür liegt in der genomischen Exon-Anordnung. Da sowohl die Promotor-Bereiche als

auch die Exons 1 und 2 des ersten Gens sowie die Exons 3-7 des zweiten Gens durch den Verlust des Fragments A nicht beeinflusst werden, ist die Produktion der T1- und T2-RNA weiterhin möglich. Dies gilt ebenfalls bei einer Deletion des Fragments B, weil dann der gesamte D1-Bereich noch unverändert vorliegt.

Eine direkter Zusammenhang mit dem in B55 vorliegenden Sh-Phänotyp besteht offensichtlich nicht, da auch in der DNA der B132-Mutanten, die keinen Sh-Phänotyp aufweisen, ebenfalls diese Deletion vorliegt.

Die 3'-Enden der duplizierten DNA-Bereiche weisen eine identische Nukleotidsequenz (TATGCAAAC) auf (Abb.18B). Teilbereiche dieser Sequenz wiederholen sich in duplizierter Form in der Nukleotidsequenz eines zwischen den Duplikationen liegenden 14bp langen Bereichs (TATGCAAAATATGC). Solche repetitiven Sequenzen werden häufig bei der Integration transposabler Elemente in *Drosophila melanogaster* generiert und bleiben nach dem Ausschneiden des Transposons in duplizierter Form erhalten. Die in den vorliegenden Sequenzen enthaltene Nukleotidabfolge TGCA wird beispielsweise als bevorzugte Integrationsstelle für *mdg4* beschrieben (Mizrokhi et al. 1985).

Ein Zusammenhang zwischen Shaker-Mutationen und den T1/T2-Genen ist mit den in dieser Arbeit erhaltenen Ergebnissen nicht zu erkennen. Zudem zeigen neue Untersuchungen, daß der B55-Bruchpunkt etwa 30-40kbp proximal zum untersuchten genomischen Bereich lokalisierbar ist (A. Baumann, persönliche Mitteilung) und somit ein direkter Bezug zu den T1/T2-Genen nicht besteht. Auch in den für Sh⁵ und Sh^{Ks133} durchgeführten Analysen kann keine Veränderung der T1- und T2-Transkripte festgestellt werden (Abb.23). Diese Analysen sind jedoch insofern limitiert, da die Art der Mutation (Deletion, Insertion oder Punktmutation) in diesen Mutanten unbekannt ist. Letztlich sind mit diesen Analysen nur dann Aussagen möglich, wenn durch die Mutation die Menge oder Größe von Transkripten verändert wird, beispielsweise durch die Insertion transposabler Elemente in die Promotor-Regionen (Snyder et al. 1982, Ikenega & Saigo 1982) oder aber in Bereiche, die intern in den Genen liegen (Karlik & Fyrberg 1985).

Die genetische Struktur des Sh-Gen-Komplexes erschwert den Nach-

weis einzelner Gene, die für die Ausprägung des Shaker-Phänotyps verantwortlich sind. So ist beispielsweise in der T(1;2)B27-Mutante, die zusätzlich die Sh^{KS133} -Mutation trägt, der Shaker-Phänotyp gegenüber Sh^{KS133} wesentlich verstärkt, obwohl der chromosomale Bruchpunkt der Mutante etwa 20kbp distal zur T1/T2-Transkriptionseinheit liegt und damit eine relativ große Distanz zu Sh^{133} aufweist. Dies läßt auf komplexe Zusammenhänge zwischen einzelnen Komponenten im Shaker-Gen-Komplex schließen.

Neue Untersuchungen lassen vermuten, daß offensichtlich ein Zusammenhang zwischen der im Mc λ -Phagen lokalisierbaren adm-Transkriptionseinheit und den rezessiv- letalen Mutanten der l2-Komplementationsgruppe besteht (Tanouye et al. 1986, A. Ferrus, persönliche Mitteilung). Die adm-Transkriptionseinheit ist in einem 3.6kbp EcoRI/HindIII-Fragment des Mc λ -Phagen lokalisierbar. Von diesem Bereich werden zwei RNAs (adm-1, adm-2) kodiert. Aufgrund der deutlichen Akkumulation dieser Transkripte in Oocyten und dem O-4 Stunden Embryonalstadium (Abb.2A) sind diese Transkripte maternal, werden also bereits während der Oogenese vom mütterlichen Genom transkribiert. Der Verlust oder die Produktion der Transkripte zu einem falschen Zeitpunkt in der Entwicklung kann eine mögliche Ursache für die Letalität der Mutanten sein, die im allgemeinen im 1. und 2. Larvenstadium zu beobachten ist.

Die zur Zeit vorliegenden genetischen Daten geben keinen Aufschluß über die relative Lage und Distanz der l2-Komplementationsgruppe zur l1- und l3-Komplementationsgruppe, so daß ein möglicher Bezug der distal zur adm-Transkriptionseinheit liegenden T1/T2-Gene nicht auszuschließen ist. Durch die Transformation (Spradling & Rubin 1982, Hazelrigg et al 1984) der Wildtyp-Gene in die rezessiv-letalen Mutanten, ist eine Möglichkeit gegeben zu untersuchen inwieweit durch diese Gene eine Normalisierung des Mutanten-Phänotyps erhalten wird, um so einen direkten Bezug auf eine funktionelle Bedeutung der T1/T2-Gene in diesen Mutanten herzustellen.

5. Zusammenfassung

Die molekulare Struktur eines genomischen DNA-Bereichs aus dem Shaker-Genkomplex von *Drosophila melanogaster* wurde analysiert. Die untersuchte Region, die im Maternalen-Effekt-Bereich lokalisiert ist, enthält zwei aufeinanderfolgende völlig identische 7.4kbp lange DNA-Bereiche.

Durch Northern-Blot Analysen wurden zwei von diesem Bereich transkribierte RNAs, T1 und T2, identifiziert. Beide RNAs sind bereits in Oocyten nachzuweisen (maternal) und werden Entwicklungsspezifisch reguliert.

Durch die Isolierung von zwei verschiedenen jedoch in den 3'-Regionen identischen cDNA-Klonen (pgt1.5 und pgt1.3), die spezifisch für die T1- und T2-Transkripte waren, konnte gezeigt werden, daß die T1- und T2- RNAs weitgehend identische 5'- und 3'-Regionen enthalten. Aus einem Vergleich der genomischen Nukleotidsequenz mit den cDNA-Sequenzen sowie über Nuklease S1 Analysen wurde die Exon - Intron Organisation der T1- und T2- Transkriptionseinheit ermittelt. Diese Analyse zeigte, daß in jedem der duplizierten genomischen 7.4kbp-DNA Bereiche eine vollständige Transkriptionseinheit für die T1- und T2-RNA vorliegt. Beide RNAs werden durch eine sich gegenseitig ausschließende Verwendung von zwei Exons über einen alternativen Spleißmechanismus aus einem Primär-Transkript generiert.

Abweichend von der in Wildtyp-DNA gefundenen Struktur des untersuchten genomischen Bereichs wurde in der DNA von B55- und B132-Translokationsmutanten eine 7.4kbp-Deletion in dieser Region nachgewiesen.

6. Literaturverzeichnis

Adams, P. (1980)

Ann. Rev. Neurosci. 3, 141-167

Adams, P. (1982)

TINS 5, 116-119

Aghajanian, G.K. (1985)

Nature 315, 501-503)

Alkon, D.L. (1984)

Science 226, 1037-1045

Appleyard, R.K. (1954)

Genetics 39, 440-452

Aviv, H & Leder, P. (1972)

Proc. Natl. Acad. Sci. USA 69, 1408-1412

Bailey, J.M., & Davidson, N. (1976)

Anal. Biochem. 70, 75

Berk, A.J. & Sharp, P.A. (1977)

Cell 12, 721-732

Bialojan, S., Falkenburg, D., Renkawitz-Pohl, R. (1984)

EMBO J. 3, 2543-2548

Birnboim, H.C. & Doly, J. (1979)

Nucl. Acids Res. 7, 1513-1523

Birnstiel, M.L., Busslinger, M. & Sturb, K. (1985)

Cell 41, 349-359

Breitbart, R.E., Nguyen, H.T., Medford, R.M., Destree, A.T.,

Mahdavi, V. & Nadal-Ginard, B. (1985)

Cell 41, 67-82

Brennan, M.D., Rowan, R.W. & Dickinson, W.J. (1984)
Cell 38, 147-151

Burke, J.F. (1984)
Gene 30, 63-68

Byrne, J.H. (1980)
J. Neurophysiol. 43, 630-668

Byrne, J.H. (1985)
TINS 8, 478-482

Chirgwin, J.M., Przybyla, A.E., MacDonald, R.J. & Rutter, W.J. (1979)
Biochemistry 18, 5294-5299

Cohen, P. (1982)
Nature 296, 613-620

Connor, J.A. & Stevens, C.F. (1971)
J. Physiol. 213, 1-30

Connor, J.A. & Stevens, C.F. (1975)
J. Neurophysiol. 38, 922-932

Conti-Tronconi, B.M. & Raftery, M.A. (1982)
Ann. Rev. Biochem. 51, 491-530

Corden, J., Wasylyk, B., Buchwalder, P., Sassone-Corsi, P.,
Kedinger, C. & Chambon, P. (1980)
Science 209, 1406-1414

Curtis, B.M. & Catterall, W.A. (1984)
Biochemistry 23, 2113-2118

Deng, G. & Wu, R. (1981)
Nucl. Acids Res. 9, 4173-4188

- Denhard, D. (1966)
Biochem. Biophys. Res. Commun. 23, 641-652
- Dierks, P., van Ooyen, A., Cochran, M.D., Dobkin, C., Reiser, J.
& Weissman, C. (1983)
Cell 32, 695-706
- Ewald, D.A., Williams, A. & Levitan, I.B. (1985)
Nature 315, 503-506
- Falkenthal, S., Parker, V.P. & Davidson (1985)
Proc. Natl. Acad. Sci USA 82, 449-553
- Farley, J. & Auerbach, S. (1986)
Nature 319, 220-223
- Fuchs, L.Y., Covarrubias, L., Escalante, L., Sanchez, S.
& Bolivar, F. (1980)
Gene 10, 39-46
- Ganetzky, B. & Wu, C.-F. (1985)
TINS 8, 322-326
- Ghosh, P.K., Reddy, V.B., Piatak, M., Lebowitz, P. & Weissman, S.M.
(1980)
Meth. Enzymol. 65, 580-595
- Gubler, U. & Hoffman, B.J. (1983)
Gene 25, 263-269
- Hagiwara, S. & Byerly, L. (1981)
Ann. Rev. Neurosci. 4, 69-125
- Hall, J.C. (1982)
Quart. Rev. Biophys. 15, 223-479
- Hanahan, D. & Meselson, M. (1980)
Gene 10, 63-67

Hazelrigg, T., Levis, R. & Rubin, G.M. (1984)
Cell 36, 469-481

Heiermann, R. (1984)
Dissertation, Ruhr Universität Bochum

Henikoff, S., Sloan, J.S. & Kelly, J.D. (1983)
Cell 34, 405-414

Hille, B. (1978)
Biophys. J. 22, 283-294

Hille, B. (1984)
in: Ionic channels of excitable membranes,
Sunderland, MA: Sinauer Assoc.

Hodgkin, A.L. & Huxley, A.F. (1952)
J. Physiol. 263, 500-544

Huez, G., Bruck, C. & Cleuter, Y. (1981)
Proc. Natl. Acad. Sci. 78, 908-911

Huynh, T.V., Young, R.A. & Davis, R.W. (1984)
in: DNA Cloning Techniques, (D. Glover, ed.) IRL Press, Oxford.

Ikenaga, H. & Saigo, K. (1982)
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 79, 4143-4147

Jan, L.Y., Barbel, S., Timpe, L., Laffer, C., Salkoff, L., O'Farrell, P.
& Jan, Y.N. (1983)
Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 48, 233-245

Jan, L.Y., Papazian, D.M., Timpe, L., O'Farrell, P. & Jan, Y.N. (1985)
TINS 8, 234-238

Kamb, A. & Iverson, L. (1984)
J. Cell. Biochem. Suppl. 8B, 106, 1114

Kandel, E.R. (1981)
Nature 293, 697-700

Kandel, E.R. & Schwartz, J.H. (1982)
Science 218, 433-443

Kaplan, W.D. & Trout, W.E. (1969)
Genetics 61, 399-409

Karlik, C.C. & Fyrberg, E.A. (1985)
Cell 41, 57-66

Keller, E.B. & Noon, W.A. (1985)
Nucl. Acids Res. 13, 4971-4981

Kidd, S., Lockett, T.J. & Young, M.W. (1983)
Cell 34, 421-433

Koerwer, W. (1983)
Dissertation, Ruhr Universität Bochum

Kozak, M. (1984)
Nucl. Acids Res. 12, 857-872

Krieg, P.A. & Melton, D.A. (1984)
Nucl. Acids Res. 12, 7057-7070

Kyte, J. & Doolittle, R.F. (1982)
J. Mol. Biol. 157, 105-132

Langridge, J., Langridge, P. & Bergquist, P.L. (1980)
Anal. Biochem. 103, 264-271

Laskey, R.A. & Mills, A.D. (1975)
Eur. J. Biochem. 56, 335-341

Maniatis, T., Hardison, R.C., Lacy, E., Lauer, J., O'Connell, C.
Quon, D., Sim, G. & Efstratiadis, A. (1978)
Cell 15, 687-701

Maniatis, T., Fritsch, E.F. & Sambrook, J. (1982)
Molecular Cloning
Cold Spring Harbor Laboratory Manual

Medford, R.M., Nguyen, H.T., Destree, A.T., Summers, E.
& Nadal-Ginard, B. (1984)
Cell 38, 409-421

Melton, D.A., Krieg, P.A., Rebagliati, M.R., Maniatis, T.,
Zinn, K. & Green, M.R. (1984)
Nucl. Acids Res. 12, 7035-7065

Messing, J., Vierra, J. (1982)
Gene 19, 269-279

Messing, J., Crea, R. & Seeburg, P.H. (1981)
Nucl. Acids Res. 9, 309-321

Michelson, A.M. & Orkin, S.H. ((1982)
J. Biol. Chem. 257, 14773-14782

Mizrokhi, L.J., Obolenkova, L.A., Priimägi, A.F., Ilyin, Y.V.,
Gerasimova, T.I. & Georgiev, G. (1985)
EMBO J. 4, 3781-3787

Mount, S.M. (1982)
Nucl. Acids Res. 10, 459-472

Müller, R. (1986)
Diplomarbeit, Ruhr Universität Bochum

Nabeshima, Y., Fujii-Kuriyama, Y., Muramatsu, M. & Ogata, K. (1984)
Nature 308, 333-338

Nakayama,H., Withy,R.M. & Raferty (1982)

Proc. Natl. Acad. Sci. USA 79,7575-7579

Nawa,H., Kotani,H. & Nakanishi,S. (1984)

Nature 312, 729-734

Noda,M., Takahashi,H., Tanabe,T., Toyosato,M., Furutani,Y., Hirose,T., Asai,M., Inayama,S., Miyata,T. & Numa,S. (1982)

Nature 299, 793-797

Noda,M., Shimizu,S., Tanabe,T., Takai,F., Kayano,F., Ikeda,T., Takahashi,H., Nakayama,H., Kanaoka,Y., Minamino,N., Kangawa,K., Matsuo,H., Raftery,M.A., Hirose,T., Inayama,S., Hayashida,H., Miyata,T. & Numa,S. (1984)

Nature 312, 121-127

Okayama,H. & Berg,P. (1982)

Mol. Cell. Biol. 3, 280-289

Peacock,S.L., McIver,C.M. & Monahan,J.J. (1981)

Biochim. Biophys. Acta 655, 243-250

Periasamy,M., Strehler,E.E., Garfinkel,L.I., Gubits,R.M., Ruiz-Opazo,N. & Nadal-Ginard,B. (1984)

J. Biol. Chem. 259, 13595-13604

Perron,C.Y., Vierra,J. & Messing,J. (1985)

Gene 33, 103-119

Petersen,O.H. & Maruyama,Y. (1984)

Nature 307, 693-696

Preiss,A., Rosenberg,U.B., Kienlin,A.,

Seifert,E. & Jäckle,H. (1985)

Nature 313, 27-32

Proudfoot,N. (1984)

Nature 307, 412-413

Queen, C. & Korn, L. (1984)
Nucl. Acids Res. 12, 581-599

Reichardt, L.F. & Kelly, R.B. (1983)
Ann. Rev. Biochem. 52, 871-926

Rogawski, M.A. (1985)
TINS 5, 214-219

Rosenfeld, M.G., Amara, S.G. & Evans, R.M. (1984)
Science 225, 1315-1320

Rozek, C.E. & Davidson, N. (1983)
Cell 32, 23-34

Ruiz-Opazo, N., Weinberger, J. & Nadal-Ginard (1985)
Nature 315, 67-70

Salkoff, L.B. & Tanouye, M.A. (1986)
Physiol. Rev. 66, 301-329

Salkoff, L.B. & Wyman, R. (1981)
Science 212, 461-463

Salkoff, L. & Wyman, R. (1983)
TINS 6, 128-133

Salkoff, L. (1983)
Nature 302, 249-251

Sanger, F., Nicklen, S. & Coulson, A.R. (1977)
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 74, 5463-5467

Schwarzbauer, J.E., Tamkun, J.W., Lemischka, I.R. & Hynes, R.O. (1983)
Cell 35, 421-431

- Shuster, M.J., Camardo, J.S., Siegelbaum, S.A. & Kandel, E.R. (1985)
Nature 313, 392-395
- Silverman, S., Schmidt, O., Söll, D., Hovemann, B.L. (1979)
J. Biol. Chem. 254, 10290-10294
- Skou, J.C. (1965)
Physiol. Rev. 45, 596-617
- Snyder, M., Kimbrell, D., Hunkapiller, M., Hill, R., Fristrom, J. & Davidson, N. (1982)
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 79, 7430-7434
- Southern, E. (1975)
J. Mol. Biol. 53, 154
- Spradling, A.C. & Rubin, G.M. (1982)
Science 218, 341-347
- Stanfield, P.R., Nakajima, Y. & Yamaguchi, K. (1985)
Nature 315, 498-501
- Strauss, E.C., Kobori, J.A. Siu, G. & Hood, L.E. (1986)
Anal. Biochem. 154, 353-360
- Tanouye, M.A., Ferrus, A. & Fujita, S.C. (1981)
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78, 6548-6552
- Tanouye, M.A., Kamb, C.A. & Iverson, L. (1984)
J. Cell. Biochem. Suppl. 8B, 10, 0857
- Tanouye, M.A., Kamb, C.A. & Iverson, L. & Salkoff, L. (1986)
Ann. Rev. Neurosci. 9, 255-276
- Tanouye, M.A. & Ferrus, A. (1985)
J. Neurogenet. 2, 253-271

Telford, J., Burckhardt, J., Butler, B. & Pirotta, V. (1985)
EMBO J. 4, 2609-2615

Twigg, A.J. & Sherratt, D. (1980)
Nature 283, 216-218

Wallace, R.B., Schold, M., Johnson, M.J., Dembeck, P. & Itakura, K.
(1981)
Nucl. Acids Res. 9, 3647-3656

Weber, K. (1986)
Diplomarbeit, Ruhr Universität Bochum

Wolfner, M. (1980)
Dissertation, Biochem. Dept. Stanford University, USA.

Wu, C.-F. & Haugland, F.N. (1985)
J. Neurosci. 5, 2626-2640

Zeevi, M., Nevins, J.R. & Darnell, E. (1982)
Mol. Cell. Biol. 2, 517-525

Lebenslauf

13.12.1953	Ralf Peter Seidel, geboren in Holzwickede, Kreis Unna
1960-1968	Besuch der Volksschule in Holzwickede
1968-1970	Besuch der gewerbl.-techn. Berufsfachschule in Unna
31.7.1970	Erlangung der Fachoberschulreife
1970-1973	Ausbildung zum Chemielaboranten bei der Hoesch Hüttenwerke AG in Dortmund
12.6.1973	Berufsabschlußprüfung
1973-1974	Besuch der Fachoberschule in Dortmund
31.7.1974	Erlangung der Fachhochschulreife
1974-1975	Technischer Angestellter beim Staatlichen Materialprüfamt in Do-Aplerbeck
1974-1976	Besuch des Abendgymnasiums der Stadt Dortmund
14.6.1976	Reifeprüfung des Abendgymnasiums
1976-1982	Studium der Chemie an der Ruhr-Universität Bochum
10.9.81-	
9.9.1982	Diplomarbeit am Lehrstuhl für Biochemie der Ruhr-Universität bei Prof. O. Pongs
27.8.1982	Eheschließung mit Reinhild Bohle
26.11.1984	Geburt unseres Sohnes Fabian Markus
1982-1986	Anfertigung der Dissertation am Lehrstuhl für Biochemie

